Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

PHYTOCHEMISCH PHARMAKOGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN EINIGER VITEX-ARTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Midian SIRAIT
aus Porsea (Sumatra)
Indonesien

1961

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

PHYTOCHEMISCH PHARMAKOGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN EINIGER VITEX-ARTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Midian SIRAIT
aus Porsea (Sumatra)
Indonesien

0264/61

Referent: Professor Dr.R.Hänsel

Korreferent: Professor Dr.G.Schenck

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung:20.6.1961

Tag der Promotion: 19. Juli 1961

Meinen lieben Eltern
und meinem Patenkind
TIO MARIAM MARINTAN SIRAIT
gewidmet.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung seines Direktors, Herrn Professor Dr. R.HÄNSEL, durchgeführt.
Ich danke meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr.R.HÄNSEL, sehr herzlich für die Anregung, das vorliegende Thema zu bearbeiten, für seine stete wissenschaftliche Förderung und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.
Ich danke Sr.Magnifizenz, dem Herrn Prorektor, Professor Dr.G.SCHENCK in seiner Eigenschaft als Direktor des Pharmazeutischen Institutes der Freien Universität Berlin für die Erlaubnis zur Benutzung der Bibliothek sowie der Geräte und Apparaturen des Pharmazeutischen Institutes.
Außerdem möchte ich Herrn Dr.E.WINDE, wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin, meinen Dank aussprechen. Er zeigte stets ein warmes Interesse für meine Arbeit. Die Durchführung dieser Arbeit wäre mir nicht möglich gewesen ohne seinen wertvollen Rat.
Mein Dank gilt den Herren Dr.Poey Seng Bouw und Drs.Sutarto, Dozenten am Institut Teknologie Departemen Pharmazie Bandung Pusat Penjelidikan Kehutanan, Djawatan Kehutanan der Republik Indonesien Bogor ,
Professor Dr.Fa Ching Chen, Taiwan University (Formosa) und Professor Dr.A.Schulz, Porto Alegre (Brasilien) für die freundliche Übersendung verschiedener Vitex-Drogen.
Herrn Professor Dr.F.BOHLMANN, Direktor des Organisch-Chemischen Institutes der Technischen Universität Berlin, danke ich für die freundliche Bereitschaft, die IR-Spektren in seinem Institut durchführen zu lassen, sowie
Herrn Dipl.Ing.J.HUBER, Leiter des analytischen Kontroll-Labors der Fa.SCHERING A.G., Berlin, für die freundliche Durchführung der Elementar-Analysen.
Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft bin ich für die Bereit-

stellung eines UV.-Spektrophotometers zu Dank verpflichtet.
Durch Stipendien der Außenkommission der Freien Universität Berlin und der Alexander von Humboldt-Stiftung Bonn war es mir erst möglich, diese wissenschaftliche Arbeit zu vollbringen. Ich danke diesen beiden Instituten dafür.
Allen denen, die sich in liebenswürdiger Weise um die Erfüllung meiner kleinen und großen Wünsche bemühten, meinen herzlichen Dank auszusprechen, ist mir ein aufrichtiges Bedürfnis.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Vorwort

I. Einleitung und Problemstellung 6

II. Botanik und Verbreitung der Gattung Vitex 7

III. Die arzneiliche Verwendung von Vitex-Drogen 9

IV. Bisher bekannte Inhaltsstoffe aus Vitex-Arten 12

V. Eigene Untersuchungen 16

H a u p t t e i l

1. Vergleichende papierchromatographische Untersuchungen der Auszüge aus Blättern von Vitex agnus castus, Vitex trifolia, Vitex negundo, Vitex pubescens und Vitex montevidensis 16

2. Die Pseudoindikane von Vitex agnus castus und Vitex trifolia und Vitex negundo 18

a) Vorkommen von Agnusid in Vitex trifolia und Vitex negundo 18

b) Versuche zur Isolierung von Aucubin aus Vitex agnus castus 20

c) Zur Konstitution von Agnusid 21

3. Flavonoide aus den Blättern von Vitex agnus cast. 25

a) Isolierung der Flavonoide F1, F2 und F3 25

b) Klassifizierung der Verbindungen F1,F2 u.F3 28

c) Spektrophotometrische Untersuchungen 28

d) Verhalten von F1, F2 und F3 gegenüber komplexbildenden Metallen 32

e) Zur Konstitution der Verbindungen F1,F2 u.F3. Identifizierung von F2 mit Luteolin-7-glukosid 34

4. Weitere phenolische Verbindungen aus Vitex agnus castus 36

5. Untersuchungen über die Wirkung von Vitex-Auszügen auf Insekten 40

6. Zusammenfassung 42

Versuchsteil

Seite

1. Papierchromatographie von Auszügen aus Vitex agnus castus, Vitex trifolia, Vitex negundo, Vitex pubescens und Vitex montevidensis 44

2. Die Pseudoindikane von Vitex agnus castus, Vitex trifolia und Vitex negundo 46

a) Isolierung von Agnusid aus Blättern von Vitex agnus castus 46

b) Hydrolyse von Agnusid mit ß-Glukosidase 46

c) Alkalische Verseifung von Agnusid 47

d) Azetylierung von Agnusid 48

e) Versuch zur Hydrierung von Agnusid 49

f) Darstellung und Hydrierung von Benzoylglukose 50

g) Darstellung und Hydrierung von Populin 51

h) Isolierung von Aucubin zu Vergleichszwecken aus den Blättern von Plantago media 53

i) Versuche zur Isolierung von Aucubin aus den Blättern von Vitex agnus castus L. 54

k) Isolierung eines Pseudoindikans R_f 0,76 aus den Blättern von Vitex trifolia L.u.V.negundo L. 55

l) Identifizierung der isolierten Verbindungen mit Agnusid 56

α) Mischschmelzpunkt mit Agnusid aus Vitex agnus castus 56

ß) UV.-Absorptionsspektren 57

γ) Papierchromatographie 58

δ) Azetylderivate 58

ε) Alkalische Verseifung 58

3. Die Flavonoide von Vitex agnus castus L. 60

a) Mikroanalytische Reaktionen auf dem Papierchromatogramm 60

b) Voruntersuchungen zur Isolierung der Flavonoide F1 (R_f 0,45), F2 (R_f 0,40) u. F3 (R_f 0,94) 61

c) Isolierung von F3 aus den Blättern von Vitex agnus castus 63

Seite

d) Isolierung der Flavonoide F1 und F2 aus den Blattextrakten von Vitex agnus castus 64

e) Reduktionsproben nach SHINODA und nach PEW 66

f) Der TAUBÖCK-Test 66

g) Optische Drehung 66

h) Säurehydrolyse 66

α) Untersuchung der Aglyka 66

ß) Identifizierung der Zuckeranteile von F1 u.F2 68

i) Perjodsäureabbau von F1 und F2 69

k) Azetylierung von F3 70

l) Verhalten von F1, F2 und F3 gegenüber Alkali; die Alkalischmelze 71

m) Elementaranalyse 72

n) UV.-Absorptionsspektren 73

o) IR.-Absorptionsspektren 74

4. Identifizierung von F2 mit Luteolin-7-glukosid 76

5. Weitere phenolische Verbindungen aus den Blättern von Vitex agnus castus 77

6. Untersuchungen über die Wirkung von Auszügen aus Vitex agnus castus auf Insekten 78

Literaturübersicht 80

Lebenslauf 83

I. Einleitung und Problemstellung

Die Blätter und Früchte verschiedener Vitex-Arten werden in vielen Ländern als heilkräftig angesehen. Kultisches Brauchtum und laienhafte, oft stark durch Aberglauben beeinflußte Vorstellungen über die Drogenwirkung an sich haben die Zahl der Indikationsgebiete im Verlaufe von Jahrhunderten stark anschwellen lassen. Der Mangel an exakten, pharmakologischen Untersuchungen macht es unmöglich, sich heute schon ein abschließendes Urteil über Wert oder Unwert dieser Drogen zu bilden.

Die häufig beobachtete Anwendung von Vitex-Drogen bei rheumatischen Erkrankungen, Bronchialkatarrh und Erkältungskrankheiten, Magenbeschwerden und Koliken sowie zur Wundbehandlung findet Parallelen bei fast allen Drogen, die ätherische Öle führen.

Größeres Interesse verdienen dagegen jene der Droge nachgesagten Wirkungen, für die das ätherische Öl offenbar nicht verantwortlich gemacht werden kann. Die im Volke verbreitete und von den der Volksmedizin nahestehenden medizinischen Richtungen gepflegte Verwendung z.B. von Vitex agnus castus, Vitex trifolia und Vitex negundo gegen Wechselfieber, oder von Vitex agnus castus und Vitex trifolia als Emenagogum läßt vermuten, daß noch andere, unbekannte und evtl. sogar wirkungsspezifische Substanzen in diesen Pflanzen enthalten sind.

Die wenigen, bisher durchgeführten phytochemischen Untersuchungen in der Gattung Vitex haben zwar zur Auffindung einiger, z.T. neuer Verbindungen (vgl.S. 15) geführt, doch konnten definierte Wirkstoffe noch nicht erhalten werden. Es war daher wichtig, diese Untersuchungen fortzusetzen.

Nachdem aus den Untersuchungen von SCHNEEGANS (1), ERBRING u. WULF (2) und WINDE (3) hervorgeht, daß entgegen anderen Angaben (4;5) Alkaloide in Vitex agnus castus nicht enthalten sind, sollten in vorliegender Arbeit die phenolischen Inhalts-

stoffe einer genaueren Betrachtung unterzogen werden. Eine Verbindung, die bereits hierher gehört, ist der von WINDE und HÄNSEL (6) isolierte p-Hydroxybenzoesäureester des Aucubins, das Agnusid. Die nochmalige Untersuchung dieses Glykosides war erforderlich, um der Klärung der noch unbeantworteten Frage näherzukommen, ob die p-Hydroxybenzoesäure mit dem Aglykon selbst, oder aber mit dem Zucker esterartig verknüpft ist. Schließlich sollte die Identität des Agnusids mit dem 1936 von GHOSE und KRISHNA (7) aus Vitex negundo isolierten Pseudoindikan überprüft werden.

II. Botanik und Verbreitung der Gattung Vitex.

Die Gattung Vitex wird nach BRIQUET (8) der Unterfamilie Viticoideae in der Familie Verbenaceae zugeordnet. Es sind von dieser Gattung heute ungefähr 200 Arten bekannt, denen sich noch zahlreiche Unterarten, meist Bastarde, zugesellen (9;10). Die meisten hierher gehörenden Gewächse sind Sträucher oder Bäume, seltener halbkletternde oder, wie z.B. Vitex pycnophylla K.SCHUM., schlingende Sträucher. Die Bäume erreichen oft beachtliche Ausmaße und werden als Lieferanten guter Nutzhölzer geschätzt. Wie alle Verbenaceen sind auch die Vitex-Arten sehr leicht an den regelmäßig gegenständigen Blättern zu erkennen. Die Blätter selbst sind meist in drei, seltener, z.B. bei Vitex agnus castus L., in fünf bis sieben Fiedern unterteilt. Die kleinen, unscheinbaren, zygomorphen Blüten sind, mehr oder weniger gedrängt, zu cymösen Blütenständen vereinigt. Den Fruchtknoten bilden zwei mehr oder weniger vollkommen miteinander verwachsene, zweifächrige Karpelle. Auffällig ist hier die besonders hohe Insertion der Samenanlagen in den Fruchtknotenfächern (11). Als Früchte werden viersamige Steinbeeren ausgebildet, die oft reichlich fettes und ätherisches Öl enthalten. Die Früchte der afrikanischen Arten Vitex cuneata SCHUM. et THONN.

und Vitex mombassae sind eßbar, die von Vitex agnus castus L. werden zuweilen als Gewürz verwendet. Die Samen weisen nach J.BRIQUET (8) kein Nährgewebe auf.

Wie die meisten Verbenaceen sind auch die Vitex-Arten fast ausschließlich tropische bzw. subtropische Gewächse. Verbreitet sind sie hauptsächlich in Asien und Amerika, seltener auf dem afrikanischen Kontinent anzutreffen. An den Küsten des Mittelmeeres, besonders auf der Krim, in Griechenland und Spanien, weniger häufig in Italien und den nördlichen Randgebieten des afrikanischen Kontinents wächst Vitex agnus castus L.. Die Pflanze ist dort auch beheimatet, wird aber seit 1560 vielfach teils als Zierpflanze, teils um die biegsamen Zweige für Flechtwerk zu gewinnen, angebaut (12). Ebenfalls seit Jahrhunderten in Kultur genommen ist Vitex trifolia L., ein Strauch, der über ganz Asien verbreitet ist und auch in Australien und Südamerika angetroffen werden kann (8;13). Ähnlich weitreichend ist das Verbreitungsgebiet der Vitex negundo L., das sich über den gesamten Raum zwischen Vorderindien bis in die östlichen Provinzen Chinas erstreckt (14). Gewisse wirtschaftliche Bedeutung kommt ferner den holzliefernden Arten, wie V. altissima L. und V. pubescens VAHL. aus Vorderindien, V. lignum-vitae A. CUNN. aus Australien oder der afrikanischen V. Cienkowsky zu; die neuseeländische V.litoralis A.CUNN. (= V.lucens T. KIRK) liefert ein unter dem Namen "Puriri" bekanntes Farbholz (12).

Einen allgemeinen Überblick über die Gattung Vitex vermittelt eine systematische Zusammenstellung von J.BRIQUET (8). Er gliedert die Gattung entsprechend dem jeweiligen Blütenbau in 4 Sektionen auf, von denen die Sect.I als die umfangreichste nochmals unterteilt wird. Als Hilfsmittel für die Aufgliederung dieser "Sectio agnus castus BRIQ. (= Sect. Euagnus SCHAU.)" dient die Ausbildung der Blütenstände. Danach werden innerhalb der Sect.I jene Vitex-Arten, deren Infloreszenzen zu terminalen Rispen angeordnet sind, zu den "Terminales BRIQ." gerechnet. Mit einer

einzigen Ausnahme, der V.bahiensis SCHAU., die in Brasilien vorkommt, sind alle hierher gehörenden Arten in Ostindien, China und Indonesien anzutreffen. Es gehören hierher u.a. die V.trifolia L., V.agnus castus L., V.altissima L. fil., V.limonifolia Wall. und V.alata. Relativ selten werden in Ostindien dagegen jene Vitex-Arten gefunden, die BRIQUET zu den "Axilares BRIQ." rechnet, deren Cymen also "einfach oder zu Rispen, aber auf axillären Stielen" angeordnet sind. Zu dieser Gruppe zählen die südamerikanischen V.vestita WALL., V.peduncularis WALL., V.leucoxylon L., V.montevidensis, V.capitata VAHL., die in Australien und Neu-Seeland beheimateten V.lignum-vitae A.CUNN., V.acuminata R.Br., V.litoralis A.CUNN., V.glabrata R.BR. sowie die V.obovata E.MEY. und die V.Zeyheri SONDER. aus Südafrika. - In Japan und China finden sich die Scheinwirtel bildenden "Glomerulosae BRIQ." mit den Arten V. cannalifolia SIEB. et ZUCC. und V.Sampsoni HANCE.

Der Sect.II, "Pyrostoma (MEY.) SCHAU.", gehören die in Südamerika heimischen V.polygama CHAM. und V.triflora VAHL. an. Sie unterscheidet sich von der Sect.III durch einen spitzer zulaufenden Kelch und eine kürzer ausgebildete Oberlippe. Vertreter der Sect.III, "Chrysomallum (DUP.-TH.) SCHAU." sind in Afrika und auf Madagaskar anzutreffen, z.B. V.Bojeri SCHAU., V.chrysolata BOJ., V.cuneata SCHUM. et THONN. und V.ferruginea SCHUM. et THONN.

Einen ungleich zweilippigen Kelch weisen die zur Sect.IV "Glossocalyx CLARKE" zählenden Arten auf, für die als Beispiel V.gamosepala GRIFF. aus Malakka genannt sei.

III. Die arzneiliche Verwendung von Vitex-Drogen.

Nicht selten werden Arten der Gattung Vitex von der Bevölkerung der tropischen Länder als Lieferanten heilkräftiger Drogen angesehen. K.BREITWIESER (15) hat sich 1942 in seiner Habilitationsschrift "Pharmakognostische Untersuchungen über Verbenaceen" der Mühe unterzogen, eine größere Anzahl dieser Pflanzen

nebst ihren Indikationsgebieten in einer Übersicht zusammenzustellen. Danach werden Vitex-Arten als Adstringentien, Stomachica und Antidiarrhoica, als Diuretica und Emenagoga, gegen Fieber, Erkältungskrankheiten und rheumatische Erkrankungen, zur Behandlung von Koliken, Geschwüren, Schlangenbissen und offenen Wunden verwendet. Verschiedene Vitex-Arten, so V.agnus castus L.(1), V.Taruma MART.(8), V.cymosa B.(16), V.moluccana BLUME und V.montevidensis CHAM.(15) sollen sich gegen Geschlechtskrankheiten bewährt haben. Die Reihe der Indikationen ließe sich noch beliebig fortsetzen, doch gründen sich alle diese Informationen im wesentlichen auf Überlieferungen der Volksmedizin und sind bisher in keinem Falle experimentell bestätigt worden. Es sollen daher im folgenden nur einige Arten näher betrachtet werden, die auf Grund ihrer weiten Verbreitung für uns von besonderem Interesse sind.

Der europäischen Volksmedizin ist wohl nur Vitex agnus castus L., der Mönchspfeffer, bekannt. Die Pflanze stand im antiken Griechenland in hohem Ansehen, wurde schon von HOMER besungen, und DIOSCORIDES (1.Jh.n.Chr.) berichtet uns, daß die athenischen Frauen während des Festes der Thesmophorien auf den Laubblättern des Vitex-Strauches schliefen und sich mit seinen Blüten schmückten (17). Von DIOSCORIDES stammt auch die erste Deutung des Namens "ἁγνός", = ohne Nachkommen, die uns zu dem heute meist diskutierten Indikationsgebiet hinführt: der Verwendung als Antaphrodisiakum. Auch andere, im Volke für Vitex agnus castus gebräuchliche Bezeichnungen, wie "Mönchspfeffer", "Abrahamstrauch", "Müllen" oder "Keuschlamm" (als Übersetzung des lateinischen "agnus castus")lassen sich in dieser Richtung deuten. Als Droge spielten besonders die Früchte eine Rolle, die durch die Klöster während des Mittelalters auch in die nördlichen Teile Europas gelangten und dort vorwiegend als Gewürz Verwendung fanden, häufig aber auch als Antaphrodisiaka empfohlen wurden (18). Es fehlt jedoch nicht an kritischen Stimmen, die diese Wirkung bestreiten (18;19). Erst in den letzten zwanzig Jahren hat man dieses Problem wieder aufgegriffen, nachdem 1939

von LINSS (20) über eine Corpus luteum ähnliche und östrusverzögernde Wirkung berichtet wurde. Auch PROBST und ROTH (21) beobachteten nach oraler Verabfolgung von Auszügen aus den Früchten an Frauen eine antiöstrogene Wirkung, und R.MOHR will überdies eine galaktagoge Wirksamkeit festgestellt haben (22). Die jüngst unternommenen Tierversuche von J.HALLER (23) scheinen die bereits von PROBST und ROTH geäußerte Vermutung zu bestätigen, daß die Wirkung spezifisch auf das Hypophysenzwischenhirnsystem gerichtet ist. Demnach würde es sich bei dem Wirkstoff pharmakologisch um einen Hypophysenblocker handeln. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, diese Substanz isoliert zu erhalten.

Die Früchte von Vitex agnus castus werden ferner verwendet als verdauungförderndes Mittel, als Antidiarrhoicum, Diaphoreticum und Diureticum (19), als Stimulans und Irritans (24). In Deutschland haben heute nur noch einige Präparate der Homöopathie Bedeutung, in denen Auszüge aus den Früchten enthalten sind, und die bei Laktationsstörungen, als Emenagoga und gegen Impotenz angewendet werden.

Die Indikationsgebiete für Vitex negundo L. und Vitex trifolia L. decken sich weitgehend. Das ist keineswegs überraschend, denn beide Arten sehen einander sehr ähnlich und kommen in den gleichen Verbreitungsgebieten vor. Blätter und Rinde besitzen einen bitteren Geschmack, weshalb sie in den asiatischen Ländern häufig als Stomachica und Fiebermittel verwendet und sogar gegen Malaria empfohlen werden.(15;25). Als weitere Indikationen nennt BREITWIESER die Anwendung als Diuretica, bei Milzerweiterung, Rheuma, Gicht, Hautkrankheiten und Geschwülsten. Besonders hervorgehoben sei, daß die Blätter dieser Vitex-Arten ebenfalls als Emenagoga gebraucht werden (25). Auch sollen sie insektifug, bzw. insektizid wirksam sein. Z.B. legt man in Indien Blätter von V. negundo zwischen die Bücher, um diese vor Insektenfraß zu bewahren (26) und M.J.van STEENIS-KRUSEMAN (27) schreibt hierzu über die Blätter von V.trifolia:

"....The acrid pungent leaves are insectifuge, boughs are hung in the houses, laid in wardrobes, etc., to drive out cockroaches, bugs and other vermin.....".

In Indien werden die Wurzeln von Vitex negundo (15), auf Java die Früchte von V.trifolia als Wurmmittel angewendet (25). Vitex trifolia wird von den Reisbauern häufig in der Nähe der Reisfelder angebaut, da die Blätter, dem Berieselungswasser beigegeben, die jungen Reispflanzen vor dem Befall durch die Reisraupe schützen sollen (15).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die Vitex-Arten für den Mediziner wie für den Pharmazeuten eine recht interessante Gattung darstellen. Insbesondere die Anwendung als Fiebermittel, als Emenagoga und als Insektizide gehören zu den Indikationen, die im Laufe von Jahrhunderten an Aktualität nichts eingebüßt haben, und es erscheint durchaus lohnend, mit pharmakologischen und mit chemischen Methoden die Überlieferungen der Volksmedizin auf ihren Wertgehalt zu prüfen.

IV. Bisher bekannte Inhaltsstoffe aus Vitex-Arten.

Mit den Inhaltsstoffen der Vitex-Pflanzen haben sich bisher nur recht wenige Autoren beschäftigt. Vielfach wurden die Untersuchungen auch sehr oberflächlich durchgeführt, so daß in der Literatur meist nur vage Andeutungen über das Vorkommen verschiedener Pflanzenstoffe zu finden sind. Das trifft in besonderem Maße für einige Alkaloide zu, die angeblich in Vitex-Arten gefunden wurden. Mir ist nur in einem Falle bekannt, daß über die Isolierung eines derartigen Stoffes berichtet wurde, und zwar 1947 von N.K.BASU und G.B.SINGH (28), die aus Vitex negundo L. das Alkaloid "Nishindin" erhalten haben.

Umstritten ist die Frage, ob auch in Vitex agnus castus L. ein Alkaloid enthalten ist. Selbst in neueren Standardwerken wird

ein Alkaloid, das "Viticin", als Inhaltsstoff von Agnus castus erwähnt (29;30). Leider war es mir nicht möglich, herauszufinden, welche Berichte nun tatsächlich diesen Angaben zugrunde liegen. Das bereits 1835 von LANDERER (4) mitgeteilte Verfahren, aus den Früchten von Vitex agnus castus eine alkaloidische Substanz zu isolieren, konnte jedenfalls von SCHNEEGANS (1) nicht reproduziert werden, und auch in neueren Untersuchungen (2;3) konnten keine Anhaltspunkte für das Vorkommen derartiger Pflanzenstoffe gewonnen werden. Die Feststellung von ORECHOFF (5), daß in den Auszügen von Vitex agnus castus mit Alkaloidreagentien fällbare Substanzen enthalten sind, kann nicht als beweisend dafür angesehen werden, daß es sich bei diesen Substanzen tatsächlich um Alkaloide handelt. - In Vitex montevidensis und V.trifolia sollen geringe Mengen an Alkaloid gefunden worden sein (15).

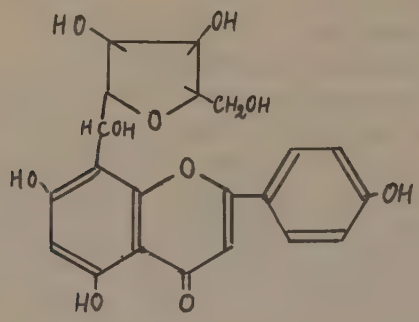
Angaben, nach denen in Vitex agnus castus Bitterstoffe enthalten seien (24), wurden bisher ebenfalls nicht bestätigt. Als Bitterstoff, bzw. "alkaloidischer" Bitterstoff wird das Castin erwähnt (15;29).

Verschiedene Arten, wie Vitex agnus castus L., V.trifolia L., V.negundo L. und V.montevidensis, enthalten ätherische Öle (15). Das aus den Früchten von Vitex agnus castus gewonnene Öl soll Cineol, Sabinen (?), und einen Sesquiterpenalkohol enthalten, während in dem Wurzelöl von V.trifolia Cineol, Pinen, Terpinylacetat und ein Diterpenalkohol gefunden wurden (15).

Die häufig in der Volksmedizin zu beobachtende Verwendung von Vitex-Drogen als Adstringentia und Antidiarrhoica findet in dem hohen Gerbstoffgehalt ihre Erklärung. Die Blätter von V.divaricatus L. enthalten etwa 14% Gerbstoff (31) und werden, wie z.B. auch V.pubescens VAHL. (32), zum Gerben von Tierhäuten verwendet. Einzelheiten über die chemische Natur dieser Verbindungen sind nicht bekannt.

Aus dem Holz von Vitex lucens T.KIRK (= V.litoralis A.CUNN.) konnte im Jahre 1898 A.G.PERKIN (33) ein Flavonoid isolieren, das er als "Vitexin" bezeichnete. Erst 1957 jedoch gelang es W,H.EVANS

und A.Mc.GOOKIN (34), die Konstitution dieser Verbindung aufzuklären. Danach handelt es sich hier um ein 8-Glykosyl-apigenin.



Vitexin

Die Glykosylnatur erklärt zugleich, daß sich Vitexin nicht mit den herkömmlichen Methoden hydrolysieren läßt, ein Umstand, der die Konstitutionsermittlung erheblich erschwert hat. Mit dieser Verbindung wurde in der Flavonoidreihe erstmalig ein neuer Typ beschrieben, von dem inzwischen im Orientin (35) und im Adonivernith (36) weitere Vertreter gefunden wurden. Das dem Vitexin isomere Saponaretin (37), das ursprünglich als Spaltprodukt des von G.BARGER (38) aus Saponaria officinalis isolierten Saponarins erhalten wurde, konnte ebenfalls im Holz von Vitex lucens nachgewiesen werden (39). Auch aus einer anderen Vitex-Art, V.peduncularis WALL., wurde Vitexin isoliert (40). In Form eines 4'-Rhamnosides ist diese Verbindung aus den Blättern von Crataegus oxycantha erhalten worden (41), und K.SEIKEL u.Mitarbeiter (42) berichteten 1959 über den papierchromatographischen Nachweis dieses Glykosides in Auszügen aus dem Holz von Vitex lucens.

Im Verlaufe sehr umfangreicher phytochemisch-analytischer

Untersuchungen über das Vorkommen einer größeren Anzahl von Pflanzenstoffen beobachtete M.GRESHOFF (43) im Jahre 1898, daß verschiedene Vitex-Arten Pseudoindikane führen. Nachgewiesen wurden sie in Vitex altissima, V.confassus, V.leucoxylon, V.Loureiri, V.negundo und V.trifolia. Aus Vitex negundo L. isolierten 1936 T.P.GHOSE und S.KRISHNA (7) eine derartige Verbindung, die beim Kochen mit Säuren in p-Hydroxybenzoesäure und einen sehr labilen Anteil, der alsbald polymerisiert, aufspaltet. Außerdem war in der Hydrolyseflüssigkeit Glukose nachzuweisen, woraus die Autoren auf die glykosidische Natur dieser Verbindung schlossen. Der Schmelzpunkt wurde mit 154-155°, die optische Drehung mit $[\alpha]_D^{20} = -92,6^\circ$ bestimmt. Der Substanz soll die Bruttoformel $C_{20}H_{24}O_{11}$ zukommen.

Über die Isolierung eines Pseudoindikans aus den Blättern von Vitex agnus castus L. berichten im Jahre 1960 WINDE und HÄNSEL (6). Die Verbindung ist der von GHOSE und KRISHNA beschriebenen offenbar sehr ähnlich; allerdings wird hier der Schmelzpunkt mit 146°, die optische Drehung mit $[\alpha]_D^{20} = -91,5^\circ$, und die ermittelte Bruttoformel mit $C_{22}H_{26}O_{11}$ angegeben. Aber auch dieses Pseudoindikan spaltet bei saurer Hydrolyse in Glukose, p-Hydroxybenzoesäure und einen labilen, schnell polymerisierenden Anteil auf. Da nach Behandlung mit Alkali als Verseifungsprodukte p-Hydroxybenzoesäure und das Glykosid Aucubin erhalten werden konnten, halten WINDE und HÄNSEL diese, als Agnusid bezeichnete Substanz für einen p-Hydroxybenzoesäureester des Aucubins.

Schließlich konnten GHOSE und KRISHNA (7) aus Vitex negundo Protocatechusäure und p-Hydroxybenzoesäure isolieren; es geht aus der Arbeit jedoch nicht hervor, ob diese Pflanzensäuren genuin in der Pflanze vorkommen, oder erst sekundär, d.h. im Verlaufe der Drogenaufbereitung entstehen.

V. Eigene Untersuchungen

Hauptteil

1. Vergleichende papierchromatographische Untersuchungen der Auszüge von Vitex agnus castus, Vitex trifolia, Vitex negundo, Vitex pubescens und Vitex montevidensis.

Aus dem Vorhergesagten kann entnommen werden, daß die Gattung Vitex sowohl von der Morphologie her, als auch vom phytochemischen Standpunkt aus betrachtet, nicht als einheitlich angesehen werden kann. Es sollte nunmehr anhand papierchromatographischer Untersuchungen ein Einblick in die Verteilung der phenolischen Inhaltsstoffe der Gattung Vitex gewonnen werden. Für diese Untersuchungen standen mir zur Verfügung die Blätter von V.agnus castus, V.trifolia, V.negundo, V.pubescens und V.montevidensis, von denen also die drei erst genannten Arten nach BRIQUET (8) den "Terminales", die beiden letzteren den "Axillares" angehören. Vielleicht war es schon durch diese Untersuchungen möglich, festzustellen, ob sich die verwandtschaftliche Stellung der einzelnen Arten zueinander in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe widerspiegelt. Eine Übersicht über das Ergebnis dieser Untersuchungen vermittelt Tabelle 1.

Schon bei oberflächlicher Betrachtung kann aus der Tabelle entnommen werden, daß sich die den "Axillares" zugehörigen Arten recht deutlich von den "Terminales" unterscheiden. Besonders fällt auf, daß sich die "Terminales" durch einen recht hohen Gehalt an Pseudoindikan auszeichnen, während bei V.pubescens nur in Spuren Agnusid und bei V.montevidensis gar kein Pseudoindikan nachgewiesen werden konnten. Daß schon während der Trocknung eine Zersetzung dieser labilen Glykoside in den Blättern von V.pubescens und V.montevidensis stattgefunden hat, woraus sich das Fehlen dieser Verbindungen auch erklären ließe, ist unwahrscheinlich. Beide untersuchten Blattdrogen waren noch recht gut erhalten. Die Zersetzung hätte sich durch eine stark dunkle Pigmentierung

der Blätter leicht erkennen lassen. Einschränkend sei jedoch darauf hingewiesen, daß M.GRESHOFF (43) in V.leucoxylon, die auch den "Axillares" zugeordnet wird, Pseudoindikan nachgewiesen hat.

R_f a	R_f b	Verbindung	V.agn. cast.	V.trif.	V.neg.	V.pub.	V.montev.
0,33	0,79	unbekannt	-	-	-	-	+
0,36	0,60	Chinasäure (?)	+	+	+	+	+
0,38	0,92	Aucubin	+	+	+	-	-
0,40	0,12	Flavonoid F2	+	+	+	+	+
0,46	0,33	Flavonoid F1	+	+	+	-	-
0,46	0,21	unbekannt	-	-	-	-	+
0,46	0,89	unbekannt	-	-	-	-	+
0,61	0,67	Chlorogensäure (?)	+	+	+	+	+
0,68	0,53	unbekannt	-	-	-	+	-
0,71	0,45	unbekannt	-	-	+	-	-
0,72	0,88	Agnusid	+	+	+	(+)	-
0,80	0,69	Kaffeesäure (?)	+	+	+	+	+
0,87	0,50	Protocatechusäure	+	+	+	-	-
0,92	0,20	Flavonoid F3	+	+	+	-	-
0,94	0,60	p-Hydroxybenzoes.	+	+	+	+	-

Tabelle 1

a: Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5, v/v/v

b: Eisessig-Wasser 15:85, v/v

Von den Flavonoiden wurden die Verbindungen F 1 und F 3 nur bei den den "Terminales" zugerechneten Arten gefunden. Die Verbindung F 2, die als Luteolin -7-glukosid (Vgl.S. 36) erkannt wurde, konnte in allen untersuchten Arten nachgewiesen werden. Dagegen konnte das Vorkommen von Vitexin, das bisher nur in den "Axillares" angehörenden Arten V.lucens und V.peduncularis nachgewiesen wurde, in keiner der von mir untersuchten Arten wahrscheinlich gemacht werden.

Anhand von Vergleichssubstanzen, die auf dem Chromatogramm mitliefen, konnte das Vorkommen von Chinasäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure in allen untersuchten Arten wahrscheinlich gemacht werden. p-Hydroxybenzoesäure konnte bei V.montevidensis nicht nachgewiesen werden; Protocatechusäure wurde nur in V.agnus castus, V.trifolia und V.negundo gefunden.

Auch V.montevidensis und V.pubescens unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe. So wurden in V.montevidensis im Gemisch "b" (Eisessig-Wasser, 15:85) bei R_f 0,21, 0,79 und 0,89 einige in V.pubescens nicht enthaltene Verbindungen nachgewiesen, die allerdings noch nicht identifiziert werden konnten. Umgekehrt enthält V.pubescens eine noch unbekannte Verbindung bei R_f 0,56, und, worauf bereits hingewiesen wurde, p-Hydroxybenzoesäure und Spuren von Pseudoindikan, die sämtlich in den Auszügen von V.montevidensis nicht gefunden wurden.

2. Die Pseudoindikane von Vitex agnus castus, Vitex negundo und Vitex trifolia.

a) Vorkommen von Agnusid in V.trifolia und V.negundo.

Werden die über Aluminiumoxyd filtrierten Auszüge von Vitex negundo und Vitex trifolia mit konzentrierter Essigsäure, die einige Tropfen Salzsäure und eine Spur Kupfersulfat enthält, einige Minuten lang gekocht, so färbt sich die Lösung tiefblau. Diese Reaktion ist sehr charakteristisch für alle Pseudoindikane und ermöglicht die Unterscheidung von anderen labilen Pflanzen-

stoffen, die papierchromatographisch nach der gleichen Methodik nachgewiesen werden können, jedoch beim Kochen mit dem obengenannten und zuerst von TRIM und HILL (44) empfohlenen Reagenz nur dunkelbraune bis schwarzbraune Verfärbungen des Reaktionsgemisches bedingen.

Nachdem WINDE und HÄNSEL (6) die in V.agnus castus enthaltenen Pseudoindikane als Aucubin und seinen p-Hydroxybenzoesäureester erkannten, war nunmehr festzustellen, ob die in Vitex negundo und Vitex trifolia nachgewiesenen Pseudoindikane evtl. mit Agnusid oder Aucubin verwandt bzw. identisch sind. Aus diesem Grunde soll in Tabelle 2 noch einmal eine zusammenfassende Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften und das chemische Verhalten dieser Substanzen gegeben werden.

	Agnusid	Aucubin
Schmelzpunkt	146° +)	182°
Bruttoformel	$C_{22}H_{26}O_{11}$	$C_{15}H_{24}O_9$
opt.Drehung	-91,5°	- 164,9°
UV-Absorption λmax.	259 mμ	(270 mμ)
Acetat, Smp.	126°	128°
Zuckeranteil	Glukose	Glukose
Aglykon	instabil: p-Hydroxybenzoesäure + Polymerisat $(C_7H_7O_2)n$	instabil: Polymerisat $(C_7H_7O_2)$ n

Tabelle 2

Bereits papierchromatographisch konnte festgestellt werden, daß das Pseudoindikan aus Vitex negundo den gleichen R_f-Wert

+) alle in vorliegender Arbeit genannten Schmelzpunkte wurden mit dem Heiztischmikroskop der Fa.LEITZ bestimmt.

(0,76) besaß, wie Agnusid. Auch die übrigen Eigenschaften der isolierten Verbindung - sie war in den Blättern zu etwa 0,3 % enthalten - stimmten völlig mit den für Agnusid beschriebenen überein: Die Substanz schmolz bei 146°, besaß ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Licht bei λ 259 mμ ($e_{spez.}$ 31,1), lieferte das gleiche Acetylderivat und ließ sich mit Alkali zu Aucubin und p-Hydroxybenzoesäure verseifen. Im Mischschmelzpunkt mit Agnusid aus Vitex agnus castus konnte keine Schmelzpunktsdepression beobachtet werden. Damit ist die Identität des von GHOSE und KRISHNA aus Vitex negundo isolierten Pseudoindikans mit Agnusid sichergestellt.

Vitex trifolia, eine in Indonesien beheimatete Vitex-Art, enthält das gleiche Glykosid. Die Identität dieses von mir aus der genannten Pflanze erstmalig isolierten Pseudoindikans mit Agnusid konnte in gleicher Weise gesichert werden, wie dies im Falle des Pseudoindikans aus Vitex negundo geschehen ist.

b) Versuche zur Isolierung von Aucubin aus Vitex agnus castus.

Bei dem zweiten Pseudoindikan, das sowohl in Vitex agnus castus, als auch in Vitex negundo und Vitex trifolia papierchromatographisch bei R_f 0,42 nachgewiesen wurde, dürfte es sich um Aucubin handeln. Es wurde versucht, diese Verbindung aus Blattextrakten von Vitex agnus castus zu isolieren. Die Nacharbeitung verschiedener, für die Darstellung von Aucubin beschriebener Methoden bereitete infolge der großen Menge mitextrahierter Begleitstoffe, die sich in bezug auf Löslichkeit und Adsorptionsfähigkeit nicht oder nur wenig von den Eigenschaften des Aucubins unterschieden, erhebliche Schwierigkeiten. Aus diesem Grunde wurde Aucubin zunächst modellmäßig aus den leichter zu beschaffenden Blättern von Plantago media, in denen es nach J.ELICH (45) in größeren Mengen enthalten ist, isoliert. Zur Darstellung eignete sich besonders ein Verfahren, nach dem der Rückstand des durch Bleiazetatfällung vorgereinigten, wäßrigen Auszuges mit viel Seesand verrieben und dann in Anlehnung an

eine von P.KARRER und H.SCHMID (46) vorgeschlagene Methode mit einem Gemisch von 15 Teilen Äthanol und 85 Teilen Aceton im SOXHLET-Apparat extrahiert wird. Nach einigen Tagen kristallisierte das Aucubin aus der eingeengten Extraktionsflüssigkeit aus.

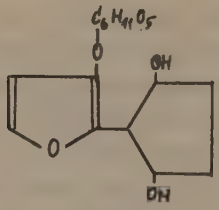
Für die Extraktion einer Verreibung des Vitex-Extraktes, der in gleicher Weise vorbereitet wurde, wie der Plantagoextrakt, erwies sich das Äthanol-Aceton-Gemisch jedoch als nicht geeignet. Wurde statt dessen ein Gemisch aus 7 Teilen Essigester und 3 Teilen Methanol verwendet, so konnten geringe Mengen der Substanz erhalten werden, die dann in Form von kleinen, farblosen Rosetten an den Gefäßwandungen auskristallisierte. Obwohl noch verunreinigt, schmolzen die Kristalle recht scharf bei 176° (Aucubin-Smp. 181 - 182°), verhielten sich aber papierchromatographisch völlig wie Aucubin.

Durch Acetylierung des durch Bleiazetatfällung von Ballaststoffen befreiten und zur Trockene eingedampften Blattextraktes konnte das Acetylderivat des Pseudoindikans erhalten werden, das den in der Literatur (46;47) für Hexaacetylaucubin beschriebenen Schmelzpunkt von 128° aufwies und im Mischschmelzpunkt mit authentischem Hexaacetylaucubin keine Schmelzpunktsdepression erkennen ließ. Die erhaltene Menge Acetylderivat war jedoch so gering, daß es mir nicht gelang, nach Verseifung zu kristallinem Aucubin zu kommen. Wohl aber stimmten die R_f-Werte des Verseifungsproduktes auf dem Papierchromatogramm wieder sehr gut mit denen von Aucubin überein.

c) Zur Konstitution von Agnusid.

Die bisherigen Untersuchungen über die Konstitution des Pseudoindikans "Agnusid" hatten die Frage offen gelassen, welche OH-Gruppe des Aucubinmoleküls mit der p-Hydroxybenzoesäure verestert ist. Für die Esterbindung standen am Aucubinaglykon zwei freie Hydroxylgruppen zur Verfügung, die nach der Formulierung

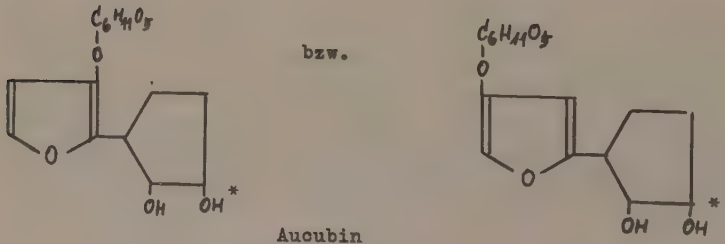
von P.KARRER und H.SCHMID (46) als gleichwertig angesehen werden mußten:



Aucubin

(KARRER u. SCHMID, 1946)

Auch der Formelvorschlag von Y.NAKAMURA (48) sieht zwei sekundäre alkoholische Gruppen vor, jedoch läßt sich denken, daß aus sterischen Gründen hier die Stellung * für die Esterbindung bevorzugt wird:



Aucubin

(Y. NAKAMURA, 1951)

Es besteht ferner die Möglichkeit, daß die p-Hydroxybenzoesäure mit einer alkoholischen Gruppe der Zuckerkomponente verestert ist. Analoge Esterbindungen sind z.B. für das Salireposid (49), das Populin (50) und das Glycosmin (51) beschrieben worden.

WINDE und HÄNSEL (6) hofften, mit ß-Glukosidase die Glykosidbindung selektiv spalten zu können und so zu einem mit der

p-Hydroxybenzoesäure veresterten Spaltprodukt zu kommen. Sie mußten jedoch feststellen, daß unter der Einwirkung des Fermentes auch die p-Hydroxybenzoesäure abgespalten wird. Eigene Versuche führten zu dem gleichen Resultat. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß während der fermentativen Hydrolyse innermolekulare Umlagerungen, wie sie bei der Bildung des Polymerisates auftreten, sekundär zur Abspaltung der p-Hydroxybenzoesäure führen, sollte versucht werden, den labilen Anteil durch Hydrierung zu stabilisieren.

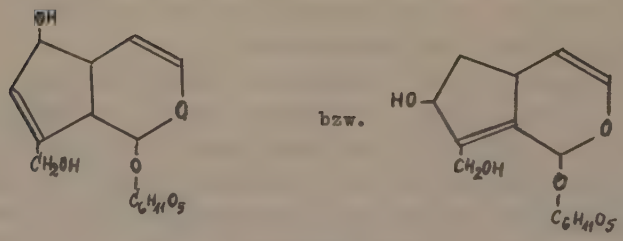
Die Hydrierung wurde unter schonenden Bedingungen, d.h. bei Normaltemperatur und normalem Druck, in methanolischer Lösung vorgenommen. Als Katalysator diente kolloides Palladium. Sehr überraschend stellte sich jedoch heraus, daß auch hierbei p-Hydroxybenzoesäure abgespalten wird. Als zweites Spaltprodukt konnte papierchromatographisch eine Substanz nachgewiesen werden, die mit dem unter gleichen Bedingungen erhaltenen Hydrierungsprodukt des Aucubins (R_f 0,66) identifiziert wurde.

Um die Stabilität von Glukoseestern unter den Bedingungen der katalytischen Hydrierung zu untersuchen, wurde einmal Glukose benzoyliert, zum anderen nach einem von H.SCHIFF (50) angegebenen Verfahren Populin dargestellt. Die papierchromatographisch reinen Verbindungen wurden in gleicher Weise, wie für Agnusid beschrieben, bei Gegenwart von kolloidem Palladium der Einwirkung von Wasserstoff ausgesetzt. Die benzoylierte Glukose (Smp. 153°) wurde hierbei nicht angegriffen. Im Falle des Benzoylsalicins+) konnte eine sehr geringfügige Abspaltung von Benzoesäure beobachtet werden; dagegen gelang der Nachweis freien Salicins nicht.

Aus diesen Ergebnissen glaube ich entnehmen zu können, daß Glukoseester durch die Hydrierung nicht, zumindest aber nicht in dem Maße, wie es bei Agnusid der Fall ist, angegriffen werden. Das spricht dafür, daß die p-Hydroxybenzoesäure mit einer der beiden alkoholischen Hydroxylgruppen des Aucubinaglykons verknüpft ist.

+) Das erhaltene Produkt schmolz bei 104°, besaß also nicht den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt von 180-183°, jedoch wurde es durch Alkalihydrolyse in Benzoesäure und Salicin aufgespalten.

In diesem Zusammenhang war für mich eine Beobachtung von H.UDA und Mitarb. (47) von besonderem Interesse. Die Autoren berichteten nämlich, daß sie bei der katalytischen Hydrierung von Hexaacetylaucubin nicht, wie erwartet werden konnte, ein Tetrahydrohexaacetylaucubin, sondern Tetrahydrodesoxypentaacetylaucubin erhielten. 1 Molekül Essigsäure wurde also bei der Reaktion abgespalten! Auf Grund dieses Verhaltens mußten die bisher angenommenen Strukturformeln für das Aucubin, die zwei freie sekundäre, also gleichwertige alkoholische Gruppen vorsahen, ernstlich in Zweifel gezogen werden. Wenig später teilten dann H.UDA und Mitarb. (51) und bald darauf auch H.SCHMID und Mitarb. (52) neue Vorschläge für die Konstitution des Aucubins mit, die beträchtlich von der bisher angenommenen Struktur abweichen:



Aucubin

(H.UDA u.Mitarb.,1960)
(H.SCHMID u.Mitarb.,1960)

(H.SCHMID u.Mitarb.,1960)

Nach den neuen Erkenntnissen besitzt Aucubin nicht zwei sekundäre, sondern eine sekundäre und eine primäre alkoholische Gruppe. Daraus ist auch die unterschiedliche Beständigkeit der Esterbindung an beiden Hydroxylen erklärlich. Es muß nun in weiteren Untersuchungen ein Weg gefunden werden, der es gestattet,

zu entscheiden, ob die p-Hydroxybenzoesäure mit der primären oder der sekundären Hydroxylgruppe verknüpft ist.

3. Flavonoide aus den Blättern von Vitex agnus castus L.

a) Isolierung der Flavonoide F 1, F 2 und F 3.

Aus den vergleichenden papierchromatographischen Untersuchungen (vgl.S. 16) ging hervor, daß in Vitex agnus castus weder Vitexin, noch Vitexin-4'-rhamnosid enthalten sind. Dagegen konnten in den Blattextrakten drei andere Flavonoide, und zwar bei R_f 0,45 (F1), Rf 0,40 (F2) und R_f 0,94 (F3) nachgewiesen werden. Auf Grund der R_f-Werte mußte es sich bei dem Flavonoid F3 um eine ausgesprochen lipophile, bei F1 und F2 um mehr hydrophile Substanzen handeln.

Dementsprechend konnte F3 durch Extraktion mit Chloroform leicht und vollständig aus der Droge herausgelöst und damit auch von F1 und F2 abgetrennt werden. Schwierigkeiten bereitete es allerdings, die Verbindung F3 von dem mitextrahierten Chlorophyll abzutrennen, da sie völlig wasserunlöslich war. In Vorversuchen beobachtete ich jedoch, daß sich diese Substanz in verdünnter Natronlauge leicht zur Lösung bringen läßt und durch Neutralisation bzw. nach leichtem Ansäuern unverändert wiedergewonnen werden kann. Daraufhin wurde nach Abdestillation des Chloroforms der zurückbleibende Chlorophyllbrei mit 5%iger Natronlauge durchgeschüttelt. Die wäßrige Flüssigkeit wurde abdekantiert, zentrifugiert und dann bis zur schwach sauren Reaktion mit verdünnter Salzsäure versetzt. Nach etwa 10 Stunden hatten sich dichte Büschel sehr feiner, langer, blaßgelber Kristallnadeln abgeschieden. Sie wurden abfiltriert, zur Reinigung in Chloroform gelöst und mit 5%iger Natronlauge ausgeschüttelt. Nach dem Ansäuern der wäßrig-alkalischen Ausschüttelung wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Da jedoch immer noch verunreinigende Bestandteile

mit in die Ausschüttelung übergingen, wurde die Chloroformphase getrocknet und über neutrales Aluminiumoxyd filtriert. Nun konnten fast alle Verunreinigungen ausgewaschen werden, während das Flavonoid am Aluminiumoxyd adsorbiert war. Seine Ablösung gelang sowohl mit 5%iger Natronlauge, als auch mit 38%iger Salzsäure nahezu quantitativ. Nach dem Ansäuern bzw. Verdünnen der Elutionsflüssigkeiten kristallisierte das Flavonoid in guter Reinheit aus. Umkristallisation aus Methanol führte zu gelben Prismen, die bei 188-189° schmolzen.

Die Flavonoide F1 und F2 wurden mit heißem Wasser aus der mit Chloroform vorextrahierten Droge herausgelöst. Auch hierbei wurden größere Mengen an Begleitstoffen mitextrahiert. Deshalb wurde der auf ein kleines Volumen eingeengte wäßrige Extrakt zur Abtrennung der einzelnen Bestandteile an Polyamid chromatographiert. Ein großer Teil sich gegenüber Polyamid indifferent verhaltender Stoffe - darunter auch Aucubin und Agnusid - konnte zunächst mit Wasser ausgewaschen werden. Die phenolischen Bestandteile hingegen blieben am Säulenkopf adsorbiert und ließen sich erst bei Anwendung von 70%igem Methanol ablösen. Dabei erfolgte eine Auftrennung in einzelne Zonen (vgl.Versuchsteil, S. 62), deren Wanderung im ultravioletten Licht verfolgt wurde. Die im UV-Licht dunkel erscheinende Zone F trennte sich erst im letzten Drittel der Säule auf in zwei etwa gleich breite Zonen F1 und F2.

Die Eluate der einzelnen Zonen wurden getrennt aufgefangen, auf ein kleines Volumen eingeengt und zur Kristallisation für einige Tage in den Kühlschrank gestellt. Aus den Fraktionen F1 und F2 kristallisierten hellgelbe Nadeln aus, die abfiltriert, aus 50 %igem Methanol umkristallisiert und über Calciumchlorid getrocknet wurden. Die Verbindung F1 schmolz dann bei 245°, F2 bei 258°.

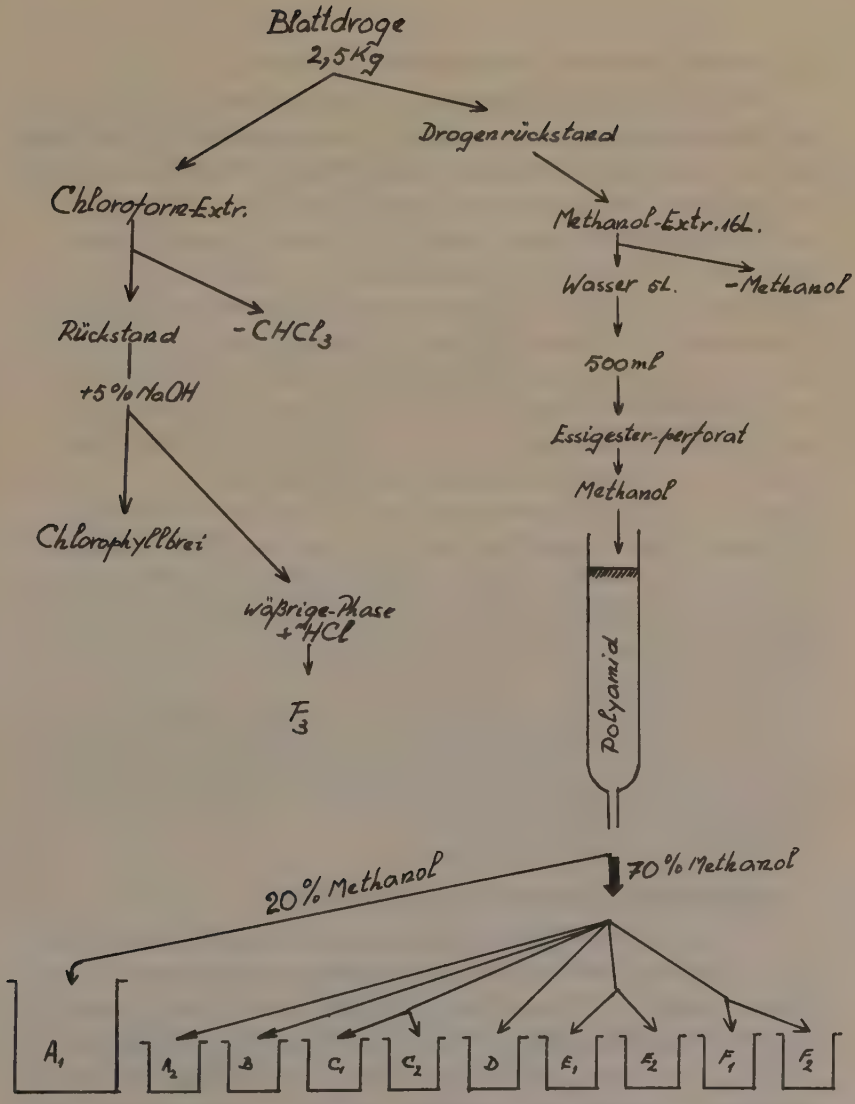


Abb.1: Schematische Darstellung der Isolierung einiger phenolischer Inhaltsstoffe aus Vitex agnus castus

b) Klassifizierung der Verbindungen F1, F2 und F3.

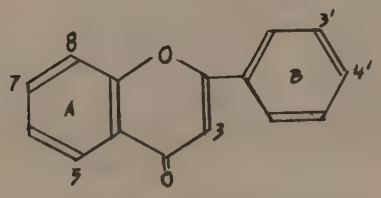
Die isolierten Verbindungen F1, F2 und F3 konnten durch die Reduktionsproben nach SHINODA (54) und nach PEW (55) auf Grund der dabei auftretenden orangeroten Färbung als Flavone erkannt werden. Durch saure Hydrolyse werden F1 und F2 in Glukose und die entsprechenden Aglyka gespalten. Es handelt sich in diesen beiden Fällen also um Flavonglukoside. Allerdings bereitete die Hydrolyse von F1 einige Schwierigkeiten, da diese Substanz nach 6-stündigem Erhitzen mit 10%iger Schwefelsäure auf 100° nur zu einem geringen Teil hydrolysiert war. Bei längerer Behandlung mit KILIANI-Mischung wurde bereits eine Zersetzung des Aglykons beobachtet. Der Verdacht, daß es sich hier um eine Glykosylverbindung, analog etwa zum Vitexin, handeln könnte, wurde durch den eindeutigen papierchromatographischen Nachweis von Glukose als Hydrolyseprodukt entkräftet. Auch wurde bei der Perjodsäureoxydation, wie bei anderen Flavonglukosiden auch, Glycerin erhalten, das aber bei dem entsprechenden Abbau des Vitexins nicht nachgewiesen werden kann. Das Aglykon der Verbindung F1 war nicht kristallin zu erhalten.

Die Verbindung F3 ließ sich nicht hydrolysieren. Es muß sich demnach um ein Aglykon handeln, was durch den ausgesprochen lipophilen Charakter dieser Substanz unterstrichen wird. Auffällig ist die große Beständigkeit von F3 nicht nur gegenüber Säuren, sondern auch gegenüber Alkalien.

c) Spektrophotometrische Untersuchungen.

Im ultravioletten Licht besitzen alle drei Substanzen übereinstimmend ein Absorptionsmaximum bei λ 350 mμ. Ein weiteres Maximum weisen die Spektren von F1 und F3 bei λ 258 mμ, von F2 bei λ 256 mμ auf (vgl.Abb.2,4 u.5). Danach müssen sich die drei Flavonoide strukturchemisch sehr nahe stehen. Eine geringe Abweichung im Verlaufe des Spektrums ist bei F1 zu beobachten, denn hier hebt sich bei 270 mμ noch ein weiteres Maximum heraus, das bei F2 und F3 nur als Inflexion angedeutet wird.

Vergleichende spektrophotometrische Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Flavonoiden führten L.JURD und R.M. HOROWITZ (57) zu der Annahme, daß bei Flavonoiden das Absorptionsmaximum zwischen 250 und 270 mμ dem chromophoren System des Ringes A entspricht.



I

Von allen an diesem Ring denkbaren Hydroxylen erwies sich die in 7-Stellung befindliche Hydroxylgruppe am stärksten dissoziiert, weshalb schon bei Zugabe von schwachem Alkali, z.B. Natriumacetat, eine deutliche, bathochrome Verschiebung der kurzwelligen Absorptionsbande um 8-19 mμ beobachtet werden kann. Eine solche Verschiebung konnte nur bei der Verbindung F1 festgestellt werden (Tab.3). Die Banden von F2 und F3 wurden nur geringfügig verschoben bzw. in ihrer Lage nicht beeinflußt, woraus geschlossen werden kann, daß nur F1 in 7-Stellung eine freie OH-Gruppe besitzt, dieselbe aber bei F2 und F3 gebunden oder nicht vorhanden ist (57). Wird die Verbindung F2 aber hydrolysiert, so ist die 256 mμ-Bande bei Gegenwart von Natriumacetat um λ^{Δ}12 mμ verschoben. Es muß gefolgert werden, daß der Zucker mit der in 7-Stellung befindlichen Hydroxylgruppe verknüpft war, daß es sich also bei F2 um ein 7-glukosid handelt.

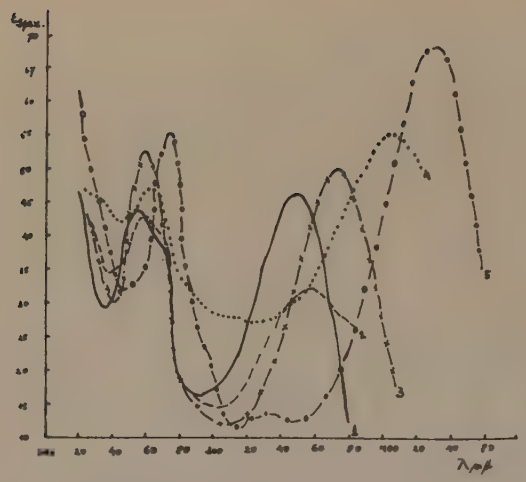


Abb.2: UV.-Absorptionsspektren von F2

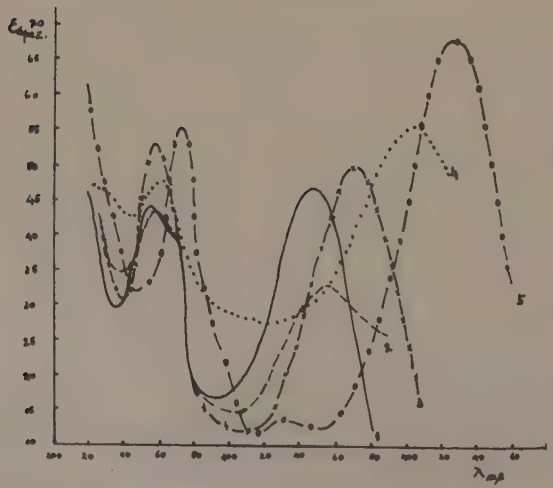


Abb.3: UV.-Absorptionsspektren von Luteolin-7-glukosid in

——— Methanol — • — • Methanol + $AlCl_3$

– – – – – Methanol + NaAc ····· Methanol + CH_3ONa

— • — • Methanol + NaAc + H_3BO_3

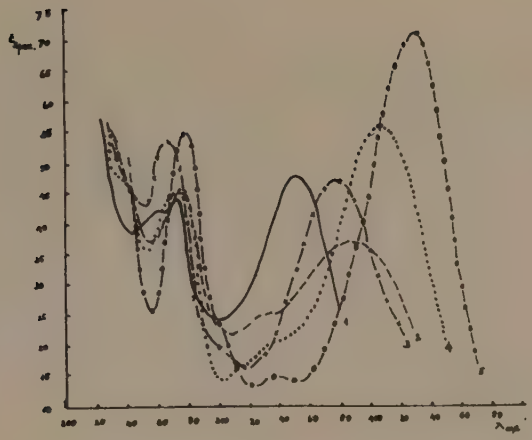


Abb.4: UV.-Absorptionsspektren von F1

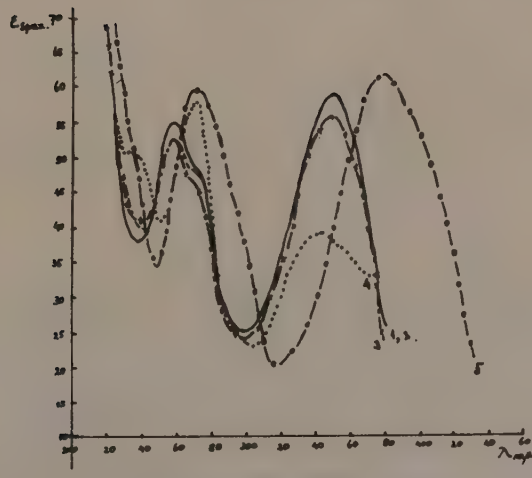


Abb.5: UV.-Absorptionsspektren von F3

in

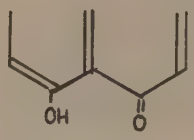
——— Methanol —•—• Methanol + $AlCl_3$

- - - - Methanol + NaAc ····· Methanol + CH_3ONa

—×—× Methanol + NaAc + H_3BO_3

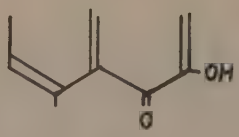
d) Verhalten von F1, F2 und F3 gegenüber komplexbildenden Metallen.

Häufig werden zur Charakterisierung von Flavonoiden Reaktionen mit Metallsalzen herangezogen, die dann je nach Art der gebildeten Komplexe zu einer mehr oder weniger intensiven Farbvertiefung führen (vgl.z.B.58;59). Die Komplexbildung ist nach P.PFEIFFER (60) im wesentlichen von folgender Gruppierung abhängig:



II

Besonders starke Komplexe, insbesondere Bor-Komplexe, liefern aber auch Flavonole, für die folgende Konfiguration zutrifft:



III

Da nun die Verbindungen F1 und F2 sowohl mit Aluminiumchlorid, als auch mit Zirkonoxychlorid Komplexe bildeten - F3 reagierte nicht mit diesen Reagentien -, war zunächst zu prüfen, ob hier evtl. eine Flavonol-Gruppierung vorlag. Für diesen Test empfahl sich die Reaktion nach TAUBÖCK (56) mit Borsäure und Oxalsäure. Die mit Verbindungen der Konfiguration II gebildeten Komplexe sind wenig stabil und lassen sich durch andere Komplexbildner leicht verdrängen, während Flavonolkomplexe beständig sind. Sie sind in ätherischer Lösung an ihrer meist grünlichen Fluoreszenz zu erkennen. Die Reaktion fiel jedoch bei F1, F2 und F3

negativ aus.

Eine weitere Bestätigung für das Fehlen einer freien 3-Hydroxygruppe lieferte die Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums in Natriummethoxydlösung: das langwellige Maximum war bei allen drei Verbindungen noch gut erhalten. Bei Verbindungen mit einer freien 3-Hydroxygruppe soll es aber fehlen (57), da sie in alkalischem Medium sehr empfindlich sind und innerhalb weniger Minuten zersetzt werden.

Lösungsmittel	F1	F2	F3
Methanol	λ max$_1$ 258 mμ	256 mμ	258 mμ
	e spez. 41,6	44,0	55,0
	λ max$_2$ 350 mμ	350 mμ	350 mμ
	e spez. 47,2	46,3	59,3
Methanol + NaAcetat	λ max$_1$ 275 mμ	259 mμ	258 mμ
	Δ max 17 mμ	3 mμ	--
	λ max$_2$ 385 mμ	355 mμ	350 mμ
	Δ max 35 mμ	5 mμ	--
Methanol + NaAc+H_3BO_3	λ max$_1$ 264 mμ	260 mμ	258 mμ
	Δ max 6 mμ	4 mμ	--
	λ max$_2$ 375 mμ	375 mμ	350 mμ
	Δ max 25 mμ	25 mμ	--
Methanol + NaMe	λ max$_1$ 270 mμ	263 mμ	270 mμ
	Δ max 12 mμ	7 mμ	12 mμ
	λ max$_2$ 405 mμ	405 mμ	345 mμ
	Δ max 55 mμ	55 mμ	-5 mμ
Methanol + $AlCl_3$	λ max$_1$ 277 mμ	274 mμ	270 mγ
	Δ max 19 mμ	18 mμ	12 mμ
	λ max$_2$ 430 mμ	430 mμ	379 mμ
	Δ max 80 mμ	80 mμ	29 mμ

Tabelle 3: UV-spektrophotometrische Untersuchungen der Verbindungen F1, F2 und F3.

Komplexbildungen sind ferner zu erwarten bei o-Dioxygruppierungen, wie sie am Ring B, vornehmlich in 3', 4'-Stellung, auftreten können. Wie J.B.HARBORNE (61) und T.SWAIN (62) beobachten konnten, treten z.B. nach Zugabe von Aluminiumchlorid bei o-dihydroxylierten Aromaten recht starke Bandenverschiebungen im UV-Absorptionsspektrum von wenigstens Δ_{max} 35 mμ ein. Bei Flavonoiden ist diese Verschiebung an der langwelligen Bande zu beobachten, woraus zu schließen ist, daß diese Bande dem chromophoren System des Ringes B entspricht. Auch bei F1 und F2 konnte ein derartiger bathochromer Effekt festgestellt werden, während bei F3 nur eine geringfügige Verschiebung eintrat (vgl.Tab.3).

In Gegenwart von Borsäure und Natriumacetat werden Bandenverschiebungen bei Flavonen nur dann beobachtet, wenn eine o-Dihydroxygruppierung vorhanden ist (63). Ähnlich wie bei der Reaktion mit Aluminiumchlorid verschoben sich auch hier nur bei F1 und F2 die 350 mμ-Bande um Δ 25 mμ, während F3 offenbar nicht reagierte. Eine Übersicht über die spektrophotometrischen Untersuchungen ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

e) Zur Konstitution der Verbindungen F1, F2 und F3. Identifizierung von F2 mit Luteolin-7-glukosid.

Auf Grund der bisher durchgeführten Untersuchungen können folgende Aussagen gemacht werden:

1.: Alle drei isolierten Verbindungen sind Flavone.

2.: F1 und F2 sind Flavonglukoside; F3 ist sehr wahrscheinlich ein Aglykon.

3.: Keines der Flavonoide trägt in 3-Stellung eine freie Hydroxylgruppe.

4.: Nur F1 trägt in 7-Stellung eine freie OH-Gruppe.

5.: F2 ist ein Flavon-7-Glukosid.

6.: Die Verbindungen F1 und F2 sind am Ring B mit wenigstens 2 Hydroxylgruppen versehen, die zueinander in o-Stellung stehen.

Aus den Ergebnissen der Elementaranalysen lassen sich für die Flavonoide F1, F2 und F3 folgende Bruttoformeln ableiten:

F1 : $C_{22}H_{24}O_{12}$

F2 : $C_{21}H_{20}O_{11}$

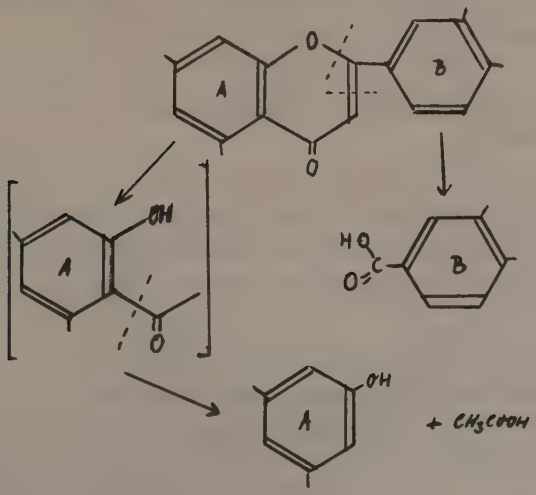
F3 : $C_{19}H_{20}O_{8}$

F1 unterscheidet sich demnach von F2 nur durch den Mehrgehalt einer Methoxylgruppe. Zieht man von der für F2 ermittelten Bruttoformel den Zuckeranteil ab, so verbleiben für das Aglykon

$$C_{15}H_{10}O_{6}$$

Da 15-C-Atome bereits auf das Flavongrundgerüst (I) entfallen, ist mit keinem weiteren, kohlenstoffhaltigen Substituenten zu rechnen. Im Grundskelett sind nur 2 Sauerstoffatome enthalten, so daß noch die Positionen von 4 Sauerstoffatomen festzulegen sind. Aus den spektrophotometrischen Untersuchungen geht hervor, daß ein Sauerstoffatom in 7-Stellung und zwei weitere in 3',4'-Stellung stehen. Für das vierte Sauerstoffatom wurde aus biogenetischen Gründen die 5-Stellung vermutet. Den Beweis hierfür sollte der Alkaliabbau liefern.

Wie Kostanecki (64) am Beispiel des Chrysins zeigen konnte, vollzieht sich der Abbau eines Flavonoids in der Alkalischmelze nach folgendem Schema:



Dementsprechend sind als Abbauprodukte von F2 Phloroglucin und Protocatechusäure zu erwarten. Sie konnten tatsächlich nach der Alkalischmelze papierchromatographisch nachgewiesen werden. Somit ist die Konstitution von F2 als die eines 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavon-7-glukosides gesichert. Eine derartige Verbindung ist seit 1936 (65) als Luteolin-7-glukosid bekannt. Die Mischschmelzpunkte von F2 und dem erhaltenen Aglykon (Smp.328-330°), dem Luteolin, mit authentischem Luteolin-7-Glukosid*) bzw. Luteolin zeigten keine Depression, und auch die UV- und IR-Spektren stimmten völlig überein (vgl.Abb.2,3 u.6,7).

Auch die Verbindungen F1 und F3 lieferten beim Alkaliabbau Protocatechusäure. Es gelang jedoch in beiden Fällen nicht, ein phenolisches Abbauprodukt zu fassen, das dem Ring A entspräche.

F3 lieferte bei der Acetylierung ein Diacetat. Das würde dafür sprechen, daß nur zwei freie OH-Gruppen im Molekül enthalten sind. Dem Verhalten gegenüber komplexbildenden Reagentien nach zu urteilen, erscheint es unwahrscheinlich, daß beide freien Hydroxylgruppen dem Ring B angehören. Sollte sich diese Annahme bestätigen, dann müßte es bei der Alkalischmelze zur Abspaltung einer Methylgruppe in 3', bzw. 4'-Stellung kommen, denn nur so ließe sich das Auftreten von Protocatechusäure als Abbauprodukt erklären.

Wegen Materialmangel mußte ich meine Untersuchungen bei diesem Stand abbrechen. Sie werden von anderer Seite fortgesetzt.

4. Weitere phenolische Verbindungen aus den Blättern von Vitex agnus castus.

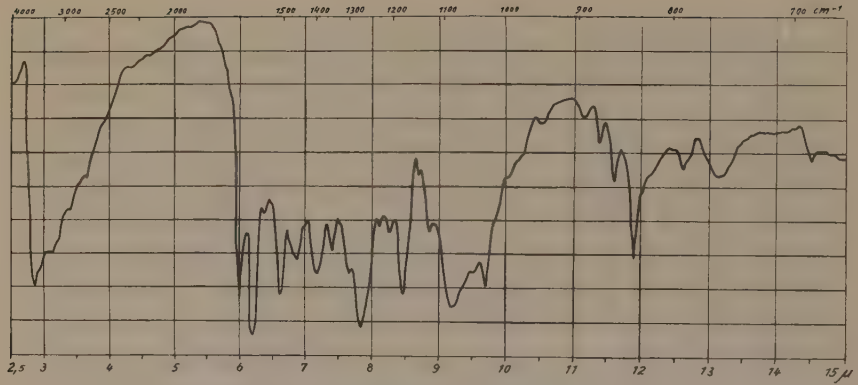
Vor Auftrennung des auf die Perlonsäule (vgl.Versuchsteil, S. 62) aufgetragenen Essigesterperforates aus dem wäßrigen Pflanzenauszug wurde zunächst mit Wasser, dann mit 20%igem Methanol gewaschen. Die abtropfende Waschflüssigkeit gab mit Alkali eine

---

*) Herrn Prof.Dr.BAERHEIM-SVENDSEN möchte ich bei dieser Gelegenheit für die freundliche Überlassung einer Probe Luteolin-7-Glukosid verbindlichen Dank sagen.

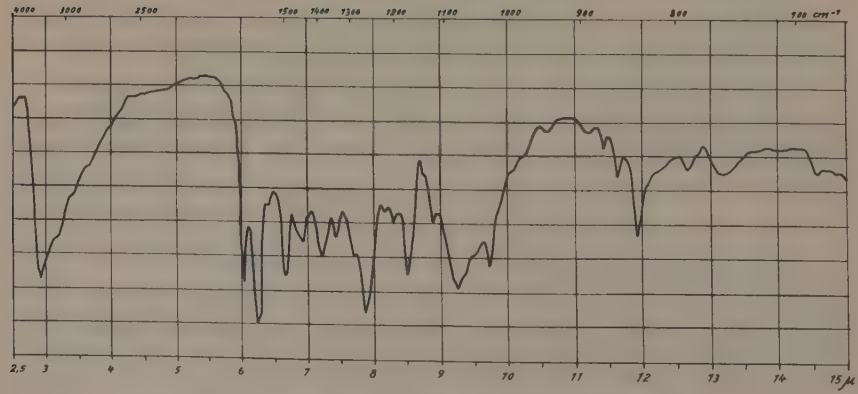
schwache Gelbfärbung, enthielt also bereits phenolische Bestandteile. Die papierchromatographische Untersuchung ergab, daß Aucubin, Agnusid und p-Hydroxybenzoesäure in der Waschflüssigkeit enthalten waren. Wurde die Waschflüssigkeit zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit Äther aufgenommen, so konnte nach Filtration und Abdampfen des Äthers reine p-Hydroxybenzoesäure kristallin erhalten werden. Da sich die wäßrig-methanolische Waschflüssigkeit jedoch schon beim Einengen dunkel färbte, ist anzunehmen, daß die p-Hydroxybenzoesäure nicht genuin in der Pflanze enthalten war, sondern während der Aufbereitung infolge teilweiser Zersetzung von Agnusid abgespalten wurde. Sehr wahrscheinlich stammen auch die von GHOSE und KRISHNA (7) aus den Blättern von Vitex negundo erhaltenen 0,3% p-Hydroxybenzoesäure zum größten Teil aus zersetztem Agnusid. In frischen Blättern von Vitex agnus castus konnten jedenfalls nur sehr geringe Mengen an freier p-Hydroxybenzoesäure nachgewiesen werden.

Das Eluat der Zone E_1 (vgl.Abb.1,S.27 u.15, S. 62) enthält ebenfalls p-Hydroxybenzoesäure. Daneben konnte aber papierchromatographisch eine zweite Substanz bei R_f 0,80 (Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:5) nachgewiesen werden, die den Hauptbestandteil des Eluates E_2 darstellte. Durch fraktionierte Sublimation konnte diese Substanz leicht von der verunreinigenden p-Hydroxybenzoesäure abgetrennt werden. Sie schmolz bei 198-200° und konnte papierchromatographisch als Protocatechusäure identifiziert werden.



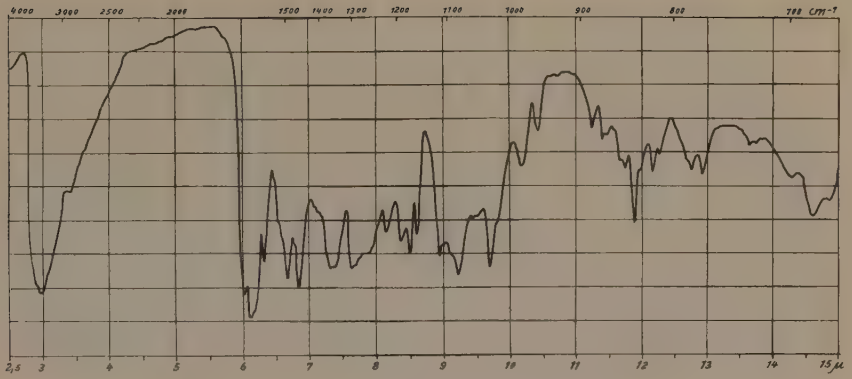
I. R.-Spektrum des Flavonoids F2 in KBr.

Abb. 6



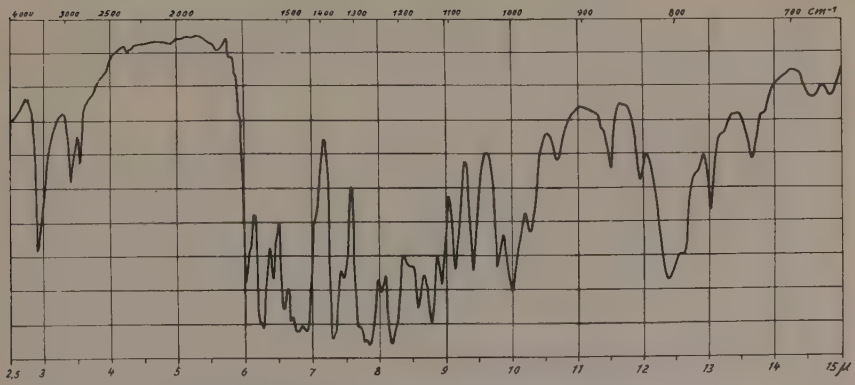
I. R.- Spektrum von Luteolin -7- Glukosid in KBr.

Abb. 7



J.R.-Spektrum des Flavonoids F1 in KBr.

Abb. 8



J.R.-Spektrum des Flavonoids F3 in KBr.

Abb. 9

5. Untersuchungen über die Wirkung von Vitex-Auszügen auf Insekten.

Von verschiedenen Autoren (vgl.S.11 u. 12) wird die Anwendung von Vitex-Drogen zur Insektenbekämpfung erwähnt. Mir erschien es lohnend, diesen Berichten einmal nachzugehen, und verschiedene Fraktionen des Aufbereitungsganges auf ihre Insektizidwirkung zu prüfen. Um für die Versuche wäßrige Pflanzenauszüge, bzw. wäßrige Substanzlösungen verwenden zu können, wählte ich als Testobjekte Insekten, die im Wasser leben, und zwar Wasserflöhe (Cyclops und Daphnien). So war es auch möglich, die Untersuchungen in Reagenzgläsern durchzuführen, was eine wesentliche Vereinfachung der Versuchsanordnung gestattete.

Die Reagenzgläser wurden mit jeweils 10-15 Organismen in je 2 ml Wasser beschickt. Dann wurden je 2 ml der auf ihre Wirkung zu testenden Lösung hinzugefügt. Mit jedem Versuch wurde ein Blindversuch gekoppelt, bei dem anstelle der Testlösung Leitungswasser verwendet wurde.

Es konnte nun beobachtet werden, daß die Tiere in den Gläsern, die wäßrige Auszüge der Blätter von Vitex agnus castus enthielten, nach 5 Stunden bewegungslos am Boden lagen und nach ca. 12 Stunden abgetötet waren. Offenbar ist die Wirkung auf Daphnien, die schon nach 2 Stunden deutlich in ihrer Motilität gehemmt waren, stärker, als auf Cyclops.

Um zu prüfen, ob das ätherische Öl, hier evtl. speziell das darin enthaltene Cineol, als Wirkstoff in Frage kommt, oder ob noch andere insektizid wirksame Substanzen in den Blättern enthalten sind, wurde das ätherische Öl durch Wasserdampfdestillation aus der zuvor grob gepulverten Blattdroge entfernt. Der danach aus dem Blattpulver hergestellte wäßrige Auszug war jedoch immer noch wirksam.

Daraufhin wurden nun die einzelnen Fraktionen, die bei der Auftrennung des Pflanzenauszuges an Polyamid erhalten wurden, auf ihre Wirksamkeit geprüft. Als besonders stark wirksam erwies sich das Eluat der Zone A (vgl.Abb. 1 , S. 27). Es gelang aber

nicht, den Wirkstoff zu isolieren. Einige, in gleicher Versuchsanordnung getestete Reinsubstanzen, die in Vitex agnus castus enthalten sind, wie Kaffeesäure, Chlorogensäure, Agnusid, Aucubin und die Flavonoide F1, F2 und F3 waren in den angewandten Konzentrationen, die absichtlich über den im rohen Pflanzenextrakt vorliegenden Konzentrationen des jeweiligen Pflanzenstoffes lagen, nicht wirksam. Erst eine 2%ige Lösung von Protocatechusäure entsprach etwa der Wirkung des Pflanzenauszuges.

Es kann also aus den Untersuchungsergebnissen der Schluß gezogen werden, daß außer dem ätherischen Öl im wäßrigen Pflanzenauszug eine auf Insekten toxisch wirkende Substanz enthalten ist. Diese Substanz konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Die bisher isolierten phenolischen Bestandteile sind an der Wirkung nicht beteiligt.

6. Zusammenfassung.

Die in vorliegender Arbeit durchgeführten phytochemisch-pharmakognostischen Untersuchungen an einigen Vitex-Arten führten zu folgenden Ergebnissen:

1. An Hand vergleichender, papierchromatographischer Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß sich die zu den "Terminales" gehörenden Arten V.agnus castus, V.trifolia und V.negundo in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe auffallend gleichen. Sie unterscheiden sich damit wesentlich von den zu den "Axillares" gerechneten V.pubescens und V.montevidensis. Alle untersuchten Arten enthalten Luteolin-7-Glukosid, jedoch wurde in keinem Falle Vitexin nachgewiesen.
2. Die Identität des von WINDE und HÄNSEL (6) beschriebenen Pseudoindikans "Agnusid" mit dem von GHOSE und KRISHNA (7) aus V.negundo isolierten labilen Glukosid konnte bewiesen werden.
3. Agnusid wurde erstmalig auch aus Vitex trifolia L. isoliert.
4. Es konnte durch entsprechende Untersuchungen wahrscheinlich gemacht werden, daß die p-Hydroxybenzoesäure im Agnusid mit einer Hydroxylgruppe des Aucubin-Aglykons verestert ist.
5. Aus Blättern von Vitex agnus castus wurden drei Flavonoide isoliert, von denen eines als Luteolin-7-glukosid (Smp.258°) identifiziert werden konnte.
   Ein weiteres Flavonoid (F1), Smp.245°, für das die Bruttoformel $C_{22}H_{24}O_{12}$ errechnet wurde, ist ebenfalls ein Glukosid. Es gelang jedoch nicht, das Aglykon kristallin zu erhalten.
   Dem dritten Flavonoid (F3), Smp.188-189°, wird die Bruttoformel $C_{19}H_{20}O_8$ zugeschrieben. Es handelt sich hierbei um ein Aglykon. Durch Acetylierung konnten zwei freie Hydroxylgruppen nachgewiesen werden.
   Alle drei Flavonoide liefern beim Alkaliabbau als Spaltprodukt Protocatechusäure. Ein weiterer phenolischer Bestandteil konnte weder bei F1, noch bei F3 identifiziert werden. Dagegen konnte nach Abbau des Luteolin-7-glukosides Phloroglucin nachgewiesen

werden.

6. Als weiterer phenolischer Inhaltsstoff wurde aus den Blättern von Vitex agnus castus Protocatechusäure isoliert. Das Auftreten freier p-Hydroxybenzoesäure in den Pflanzenextrakten wird auf vorangegangene Zersetzung von Agnusid zurückgeführt.
7. Die Wirkung von Blattextrakten aus Vitex agnus castus auf Insekten wurde an Wasserflöhen (Cyclops und Daphnien) überprüft. Dabei wurden Anhaltspunkte dafür gefunden, daß neben dem ätherischen Öl in den Blättern noch ein leicht wasserlöslicher und auf Insekten toxisch wirkender Stoff enthalten ist.

Versuchsteil

1. Papierchromatographie von Auszügen aus Vitex agnus castus, Vitex trifolia, Vitex negundo, Vitex pubescens und Vitex montevidensis.

Jeweils 1,0g der pulverisierten Blattdroge wurde 10 Min. lang auf dem Wasserbade mit je 5 ml Methanol ausgekocht. Die noch heißen Auszüge wurden filtriert und auf ca 2 ml eingeengt. Von diesen Extrakten wurden jeweils 0,2 ml mit einer Mikropipette auf den Startpunkten des Chromatogramms (Papier:SCHLEICHER u.SCHÜLL 2043b) angereichert. Chinasäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure, p-Hydroxybenzoesäure und Protocatechusäure liefen als Vergleichssubstanz mit. Entwickelt wurde ein Chromatogramm mit der Oberphase des Systems I=Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5, V/V/V), ein anderes mit dem Gemisch II=Eisessig-Wasser (15:85,V/V) über Laufstrecken von etwa 20 cm, aufsteigend. Die Markierung der Flecken erfolgte

a) im Tageslicht

b) im UV-Licht

c) unter der Purinlampe (UV-Licht des Wellenbereiches 250 und 260 mμ

Zur näheren Charakterisierung der einzelnen Flecken wurden folgende Reaktionen durchgeführt:

1. Behandlung mit Ammoniak-Dämpfen
2. Besprühen mit 1%iger $FeCl_3$-Lösung (methanolisch)
3. Besprühen mit 1%iger Bleiacetatlösung (methanolisch)
4. Besprühen mit 2%iger Zirkonoxychloridlösung (methanolisch)
5. Besprühen mit einer Lösung von diazotierter Sulfanilsäure und nachfolgende Behandlung mit Ammoniakdämpfen
6. Besprühen mit einer Lösung von p-Nitranilin, dann mit 20%iger Natriumcarbonatlösung
7. Besprühen mit 5%iger Trichloressigsäurelösung und nachfolgendes Erhitzen auf 100° im Trockenschrank.

R_f		unbehandelt			behandelt mit Reagenz														untersuchte Pflanzen					Deutung der Flecken
					1		2		3		4		5	6	7									
I	II	a	b	c	a	b	a	b	a	b	a	b	a	a	a	b			A	B	C	D	E	
0,33	0,79	br	br	-	br	br	gr	d	-	-	g	br	-	-	-	-			-	-	-	+	+	unbekannt
0,36	0,60	-	gr	-	-	gr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	Chinasäure (?)
0,38	0,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	br	r			+	+	+	-	-	Aucubin
0,40	0,12	g	d	d	g	g	gr	d	g	or	g	g	g	g	-	-			+	+	+	+	+	F2,Luteolin-7-Glukos.
0,46	0,33	g	d	d	g	br	gr	d	g	or	g	g	g	g	-	-			+	+	+	-	-	F1, Flavon
0,46	0,21	-	d	d	-	br	-	-	g	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	+	unbekannt
0,46	0,89	-	-	d	-	br	gr	d	g	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	+	unbekannt
0,61	0,65	-	bl	bl	-	gr	gr	d	g	-	-	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	Chlorogensäure
0,68	0,53	-	bl	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	+	-	(?)Pflanzensäure
0,71	0,45	-	bl	d	-	bl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	+	-	-	unbekannt
0,72	0,88	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r	br	r			+	+	+	(+)	-	Agnusid
0,80	0,69	-	bl	bl	-	bl	gr	d	g	-	-	-	-	-	-	-			+	+	+	+	+	Kaffeesäure
0,87	0,50	-	-	dbl	-	-	gr	-	-	-	-	-	blv	-	-	-			+	+	+	-	-	Protocatechusäure
0,92	0,20	g	d	d	g	d	gr	-	gr	-	g	d	g	-	-	-			+	+	+	-	-	Flavon, F3
0,92	0,94	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	+	unbekannt
0,94	0,60	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	g	r	-	-			+	+	+	+	-	p-Oxybenzoesäure
	0,90	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	+	unbekannt

Tabelle 4: Papierchromatographie der Auszüge aus
Vitex agnus castus (A), Vitex trifolia (B), Vitex negundo (C),
Vitex pubescens (D), Vitex montevidensis (E)

Es bedeuten: bl = blau, blv = blauviolett, dbl = dunkelblau, d = dunkel, g = gelb, gr = grün, br = braun,
or = orange, r = rot

2. Die Pseudoindikane von Vitex agnus castus, V.trifolia und V.negundo.

a) Isolierung von Agnusid aus Vitex agnus castus L.

800,0 g vorsichtig getrockneter und pulverisierter Blätter von Vitex agnus castus L. wurden in Anteilen zu je 200,0 g durch zweimaliges Kochen mit je 1 L Petroläther entfettet und dann nach Zusatz von 1,0 g Calciumcarbonat mit je 3 L Methanol heiß extrahiert. Der methanolische Auszug wurde noch warm von der Droge abgepreßt, filtriert und unter vermindertem Druck eingedampft. Nach restloser Entfernung des Methanols wurde der Rückstand mehrmals mit 60° warmem Wasser behandelt, bis die abdekantierte wäßrige Flüssigkeit keine Pseudoindikanreaktion mehr gab. Insgesamt wurden hierfür 4 L Wasser benötigt. Der überwiegende Teil der Begleitstoffe konnte nach Einengen der abdekantierten Flüssigkeit auf etwa 1000 ml mit neutralem Bleiazetat ausgefällt werden. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit vorsichtig abgegossen. Nach Ausfällung des überschüssigen Bleis mit H_2S wurde filtriert, das Filtrat auf 500 ml eingeengt und mit Essigester ausgeschüttelt. Die Ausschüttelung wurde so lange fortgesetzt, bis die Essigesterphase keine Pseudoindikanreaktion mehr gab. Die vereinigten Ausschüttelungen wurden nach Trocknung über Natriumsulfat bis zum Auftreten einer leichten Trübung eingeengt. Nach dem Erkalten schied sich Agnusid als weiße Kruste an den Wandungen des Kolbens ab. Ein geringer Zusatz von Petroläther führte zur weiteren Abscheidung dieser Substanz. Das so erhaltene Glykosid wurde durch mehrere Umkristallisationen aus wasserfreiem Essigester gereinigt und besaß dann einen Schmelzpunkt von 146°. Insgesamt wurden 2,0 g Agnusid erhalten.

b) Hydrolyse von Agnusid mit ß-Glukosidase.

Ca 15 mg Agnusid wurden in 10 ml Wasser gelöst. Von dieser Lösung wurde in 8 Reagensgläser jeweils 1 ml gegeben. Mit Azetatpufferlösungen wurden die Gläser 1 und 1a auf pH 4.2, 2 und 2a auf pH 4.6, 3 und 3a auf pH 5 eingestellt. Die Gläser 4 und 4a blieben ohne Pufferlösung (gemessener pH: 4.8). Zu den Ansätzen 1,2,3 und 4

wurde je 1 ml einer wäßrigen Lösung von ß-Glucosidase (Fa.FLUKA, Buchs SG, Schweiz) im Gewichtsverhältnis von ca 1:100 hinzugefügt; die Ansätze 1a, 2a, 3a und 4a dienten als Blindversuch und enthielten kein Ferment. Die Gläser wurden, mit einem Wattestopfen verschlossen, bei 30°C im Trockenschrank aufbewahrt. Nach 2,5,15, 24 und 48 Stunden wurden Proben entnommen und chromatographiert. Über das Ergebnis gibt folgende Tabelle Aufschluß:

Ansatz Nr.	Beobachtete Verfärbung d.Lösung nach Std.:					papierchromatographisch wurden nachgewiesen:
	2	5	15	24	48	
1	-	-	-	(+)	+	Agnusid, p-Oxybenzoesäure, Glukose, Polymerisat
1a	-	-	-	-	-	Agnusid
2	-	-	-	+	+	Agnusid, p-Oxybenzoesäure, Glukose, Polymerisat
2a	-	-	-	-	-	Agnusid
3	-	-	+	++	++	p-Oxybenzoesäure, Glukose, Polymerisat
3a	-	-	-	-	-	Agnusid
4	-	-	+	++	++	p-Oxybenzoesäure, Glukose, Polymerisat
4a	-	-	-	-	-	Agnusid

Tabelle 5: Fermentative Hydrolyse von Agnusid

c) Alkalische Verseifung von Agnusid.

In 30 ml einer 1.2%igen methanolischen Lösung von Bariumhydroxyd wurden 100 mg Agnusid zur Lösung gebracht. Der Ansatz wurde dann 1/2 Stunde lang auf 60° erwärmt. Nach dem Erkalten wurde CO_2 eingeleitet. Das abgeschiedene Bariumcarbonat wurde abzentrifugiert und nach dem Abdekantieren der überstehenden Flüssigkeit mit 5 ml Wasser gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die abdekantierte Lösung wurde mit der Waschflüssigkeit vereinigt,

filtriert und unter stark vermindertem Druck bei ca 40° zur Trockene eingedampft. Durch mehrmaliges Behandeln des Rückstandes mit je 10 ml Äther konnte die abgespaltene p-Hydroxybenzoesäure entfernt werden. Sie wurde nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels durch Umkristallisation aus Wasser in reiner Form mit dem Schmelzpunkt 210° erhalten.

Der ätherunlösliche Rückstand wurde in 5 ml Äthanol aufgenommen, bis zum Auftreten einer leichten Trübung mit Äther versetzt und 48 Stunden lang im Kühlschrank stehen gelassen. An den Wandungen des Gefäßes hatten sich weiße, zu Rosetten gruppierte Nadeln ausgeschieden, die nach zweimaliger Umkristallisation aus Äthanol und Äther bei 182° schmolzen. Aus den Mutterlaugen ließen sich nach erneutem Ätherzusatz weitere Mengen dieser Substanz erhalten, die eine deutliche Pseudoindikanreaktion gab und im Mischschmelzpunkt mit Aucubin, das aus Plantago-media-Blättern isoliert wurde, keine Depression zeigte.

d) Acetylierung von Agnusid.

500 mg Agnusid wurden in 5 ml Pyridin gelöst und nach Zusatz von 10 ml Essigsäureanhydrid 48 Stunden lang unter gelegentlichem Umschütteln stehen gelassen. Das Gemisch wurde dann bis zur Sirupkonsistenz eingeengt und mit 50 ml Eiswasser versetzt. Der Ansatz blieb etwa 30 Minuten lang stehen, wobei von Zeit zu Zeit umgeschüttelt wurde. Anschließend wurde mit einem Gemisch von Essigester und Äther (1:1, v/v) - insgesamt etwa 80 ml - mehrmals ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde verworfen. Die Oberphase wurde fünfmal mit je 10 ml 1%iger Salzsäure, dann dreimal mit je 10 ml 5%iger Natriumbicarbonatlösung und schließlich fünfmal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde die Essigester-Ätherphase auf 25 ml eingeengt und mit 5 ml Petroläther versetzt. Nach drei Stunden fiel ein weißer, voluminöser Niederschlag aus, der abfiltriert und im evakuierten Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet wurde. Aus der Lösung des Rückstandes in wasserfreiem Essigester-Äthergemisch wurde

auf Zugabe von Petroläther eine mikrokristalline Substanz erhalten, die bei 124-126° schmolz.
Die Acetyl-Bestimmung ergab für das Acetylierungsprodukt

$C_{32}H_{36}O_{16}$ (M.G. 676,43) Ber.: 31,3 % CH_3CO
Gef.: 31,5 % CH_3CO,

woraus sich ein Gehalt an fünf Acetylgruppen ergibt.

e) Versuch zur Hydrierung von Agnusid.

Die Schüttelente der Hydrierapparatur wurde mit einer Lösung von 80 mg Agnusid in 30 ml Methanol gefüllt und mit Wasserstoff gesättigt. Dann wurde 1 ml einer Aufschlämmung von kolloidem Palladium (nach PAAL; Fa.Th.SCHUCHARDT, München) als Katalysator hinzugefügt und 60 Minuten lang hydriert. In dieser

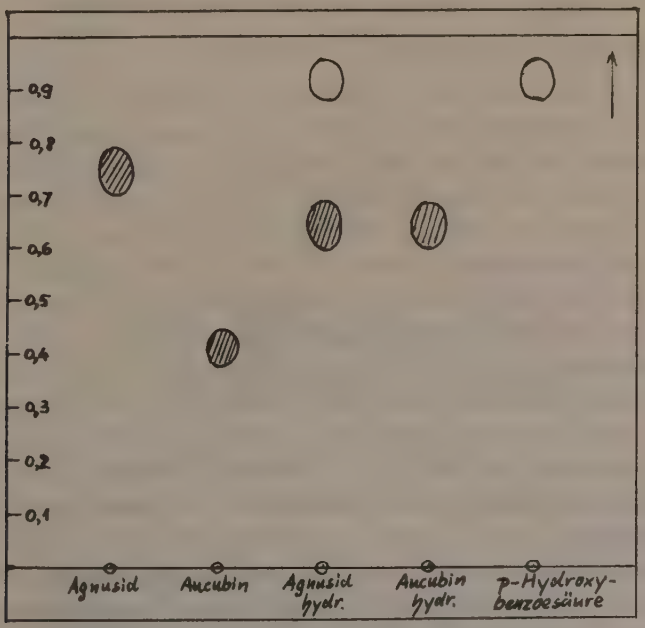


Abb.10: Papierchromatogramm von Agnusid nach der Hydrierung

Zeit wurden 4 ml Wasserstoff aufgenommen. Danach erfolgte auch bei höherer Temperatur (40°) keine weitere Wasserstoffaufnahme. Durch Zusatz von 30 ml Äther wurde das Palladium ausgefällt. Die Lösung wurde filtriert und zur Trockene eingeengt, der Rückstand in Methanol aufgenommen. Eine kristalline Substanz ließ sich aus dieser Lösung nicht erhalten. Papierchromatographisch war freie p-Hydroxybenzoesäure sowie - nach Besprühen mit 5%iger methanolischer Trichloressigsäurelösung und Erhitzen des Chromatogramms auf 105° - eine Verbindung als dunkler Fleck nachzuweisen, deren R_f-Wert (0,66) sich deutlich von dem des Aucubins (R_f 0,42) unterschied. Die Substanz R_f 0,66 gibt beim Erhitzen der Lösung mit Reagenz A auch keine Blaufärbung, sondern eine Rotfärbung. Wird Aucubin unter den gleichen Bedingungen hydriert, so kann ebenfalls die Verbindung R_f 0,66 erhalten werden.

f) Darstellung und Hydrierung von Benzoylglukose.

In Anlehnung an ein von FISCHER und BERGMANN (67) ausgearbeitetes Verfahren zur Herstellung von Penta-p-Hydroxybenzoylglukose wurde ein Gemisch von 3g Glukose, 14 g Benzoylchlorid, 13,2 g Chinolin und 20 ml Chloroform 2 Stunden lang auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Die braungefärbte Lösung wurde noch 3 Tage lang stehen gelassen und dann mit Chloroform auf 100 ml verdünnt. Nach dem Eintropfen in 500 ml Petroläther wurde der Ansatz eine Woche lang in den Kühlschrank gestellt. Die ausgeschiedenen weißen Kristallnadeln wurden dreimal aus einem Gemisch Chloroform-Petroläther (1:1) umkristallisiert. Geringe Anteile noch enthaltener Benzoesäure konnten durch Waschen mit Äther entfernt werden. Schließlich wurde die Substanz im Vakuumexsikkator über Calciumchlorid getrocknet. Der Schmelzpunkt lag dann bei 153°.

60 mg dieser benzoylierten Glukose wurden unter den gleichen Bedingungen, wie für Agnusid beschrieben, der Einwirkung von Wasserstoff ausgesetzt. Durch Papierchromatographie wurde der Erfolg der Hydrierung kontrolliert. Als Laufmittel diente Butanol-

Ammoniak (10%)-Wasser, 4:1:5, v/v/v/. Es wurde aufsteigend chromatographiert; die Laufzeit betrug 4 1/2 Stunden. Die Markierung der Flecken auf dem getrockneten Chromatogramm erfolgte mit Hilfe einer Purinlampe, d.h. einer UV-Analysenlampe mit gefilterten Emissionslinien bei 270 mμ.

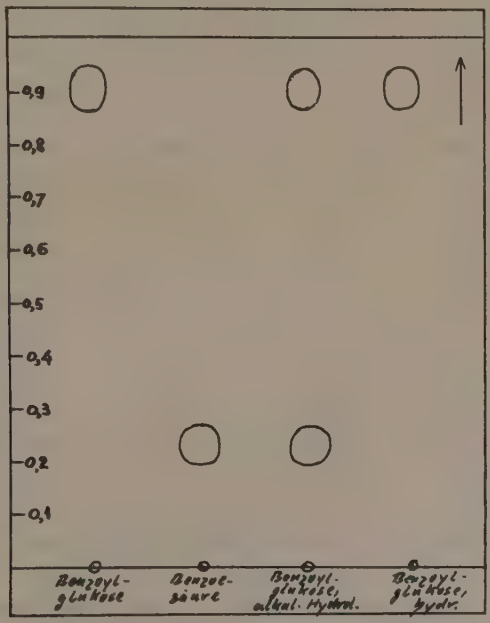


Abb.11: Chromatographie von Benzoylglukose vor und nach der Hydrierung

g) Darstellung und Hydrierung von "Populin".

Zur Darstellung von Populin wählte ich ein von H.SCHIFF (50) vorgeschlagenes Verfahren: In einem Rundkolben wurden 12,8 g Salicin "MERCK" mit 10 g Benzoesäureanhydrid zusammengeschmolzen. Die Schmelze wurde nach dem Erkalten in 200 ml heißem Wasser aufgenommen und filtriert. Dabei blieben die in Wasser sehr schwer löslichen Tri- und Tetrabenzoylderivate des Salicins zum über-

wiegenden Teil auf dem Filter zurück. Das Filtrat wurde zur Trockene eingedampft. Durch häufiges Waschen mit Aether wurde der Rest an Tri- und Tetrabenzoylsalicin, aber auch die restliche freie Benzoesäure entfernt. Ungebundenes Salicin konnte dann aus dem Rückstand mit kaltem Wasser herausgewaschen werden. Es blieb ein schwach bräunlich gefärbter, kristalliner Rückstand, der papierchromatographisch einheitlich war, jedoch nicht den in der Literatur für Populin angegebenen Schmelzpunkt von 180 - 183° aufwies, sondern schon bei 104° schmolz. Ich vermute daher, daß es sich um ein Gemisch von Mono- und Dibenzoylsalicin handelt. Es läßt sich durch Alkali zu Salicin und Benzoesäure verseifen. Auf die Auftrennung der beiden Verbindungen wurde verzichtet.

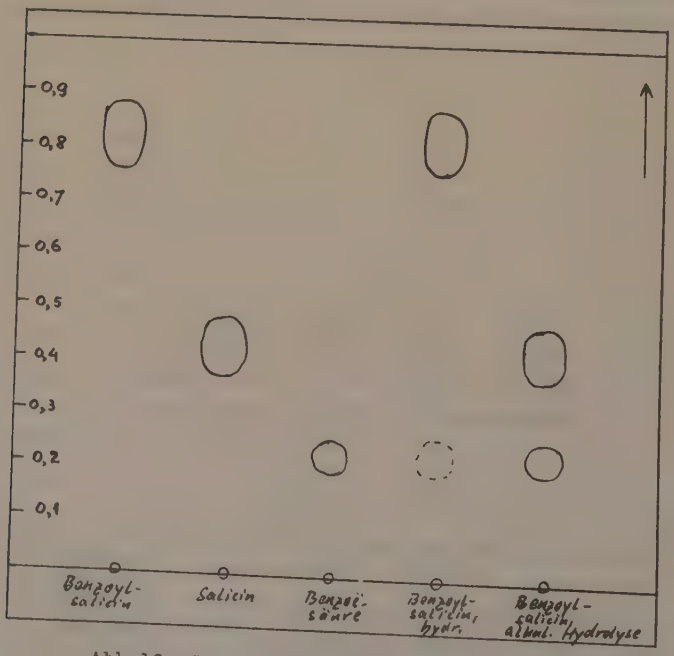


Abb.12: Chromatographie von Benzoylsalicin vor und nach der Hydrierung

Das Gemisch wird im folgenden als "Benzoylsalicin" bezeichnet.

60 mg des über Phosphorpentoxyd getrockneten Benzoylsalicins wurde, wie für Agnusid (S. 49) beschrieben, den Bedingungen der katalytischen Hydrierung ausgesetzt. Es wurden Proben der Substanz vor und nach der Hydrierung neben Salicin und Benzoesäure chromatographiert. Dabei diente als Laufmittel das System Butanol-Ammoniak (10%-Wasser, 4:1:5, v/v/v, mit dem aufsteigend über eine Laufstrecke von ca. 20 cm chromatographiert wurde. Die Flecken konnten, wie im Falle der Benzoylglukose, unter der Purinlampe sichtbar gemacht werden.

h) Isolierung von Aucubin zu Vergleichszwecken aus den Blättern von Plantago media.

Als Ausgangsmaterial für die Aucubingewinnung wurden im Juli, also zur Blütezeit, ca. 2 kg Blätter von Plantago media frisch geerntet, zerkleinert und mit 10 L Wasser ausgekocht. Die Droge wurde noch heiß abgepreßt, die Extraktionsflüssigkeit nach dem Erkalten filtriert. Das Filtrat wurde in einem Umlauf-Verdampfer bei ca 30°C auf 1 L konzentriert. Dann wurden die störenden Begleitstoffe durch tropfenweise Zugabe einer 20%igen Bleiazetatlösung ausgefällt. Die Fällung wurde abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und filtriert. Nach Ausfällung des überschüssigen Bleis als Bleisulfid durch Schwefelwasserstoff und Filtration wurde das Filtrat sofort mit 1 g Calciumcarbonat versetzt und bei 60°C eingedampft. Es blieb ein sirupartiger, zäher Rückstand zurück, der in 25 ml Methanol aufgenommen und mit Seesand verrieben wurde. Der verwendete Seesand wurde zuvor mit einem Gemisch von Aceton und Äthanol (9:1, v/v) so lange gewaschen, bis eine Probe der Waschflüssigkeit nach dem Abdampfen keinen Rückstand mehr hinterließ. Die Verreibung wurde im Trockenschrank bei 60° getrocknet und dann nochmals im Mörser verrieben, ehe sie im SOXHLET-Apparat 4 Stunden lang mit Äthanol-Aceton (1:9,v/v) extrahiert wurde. Der Auszug wurde auf ca 150 ml eingeengt und dann eine Woche lang bei +2° im Kühl-

schrank aufbewahrt. Nach dieser Zeit hatte sich das Aucubin in weißen Kristallrosetten an den Gefäßwandungen abgeschieden. Es wurde durch Umkristallisation aus Wasser gereinigt und besaß dann einen Schmelzpunkt von 181-182°. Ausbeute: ca 1g Reinaucubin.

i) Versuche zur Isolierung von Aucubin aus den Blättern von Vitex agnus castus L.

Nach der Entfernung von Agnusid durch Ausschüttelung des wäßrigen Pflanzenauszuges mit Essigester (vgl.S.46) wurde die wäßrige Phase bei Gegenwart von etwas Calciumcarbonat auf 300 ml eingeengt.

α) 100 ml dieses Extraktes wurden bei 60° zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 20 ml Methanol zur Lösung gebracht und mit 200 g Seesand verrieben. Im Trockenschrank wurde die Verreibung bei 60° getrocknet, danach noch einmal gut verrieben und schließlich im SOXHLET-Apparat mit einem Gemisch von Aceton und Äthanol (85:15,v/v) - in Anlehnung an die von KARRER (46) für die Darstellung von Aucubin angewandte Methode - 4 Stunden lang extrahiert. Dann wurde der Extrakt auf 100 ml eingeengt und in den Kühlschrank gestellt. Es gelang jedoch, auch nach weiterem Einengen, nicht, zu einer kristallinen Verbindung zu kommen. Die erhaltenen Abscheidungen waren von harziger oder öliger Beschaffenheit.

ß) Weitere 100 ml der von Agnusid befreiten wäßrigen Phase wurden, wie unter α) beschrieben, eingeengt und mit Seesand verrieben. Als Extraktionsmittel wurde jedoch diesmal ein Gemisch von Essigester und Methanol (7:3, v/v) verwendet. Aus dem auf 100 ml eingeengten Auszug schieden sich nach einwöchigem Stehen im Kühlschrank sehr kleine Mengen einer kristallinen Substanz ab, die sich papierchromatographisch als mit Aucubin identisch erwies. Der Schmelzpunkt der allerdings noch stark verunreinigten Kristalle lag bei 176°. Eine Umkristallisation war wegen der sehr geringen Ausbeute nicht mehr durchführbar.

γ) Nach einem Vorschlag von KARRER (46) wurde nun versucht, über das Acetylderivat zum reinen Aucubin zu kommen. Hierzu

wurden die restlichen 100 ml der wäßrigen Phase zur Trockene eingeengt und im Exsikkator nachgetrocknet. Der Rückstand wurde dann in 15 ml Pyridin gelöst, mit 30 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Gemisch wurde nach Zugabe von 50 ml Eiswasser 1/2 Stunde lang beiseitegestellt und dann mit einem Gemisch von Essigester und Äther (1:1, v/v) ausgeschüttelt. Die Ausschüttelung wurde zur Entfernung des Pyridins und der überschüssigen Essigsäure nacheinander je einmal mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung, mit 1%iger Salzsäure, nochmals mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung und schließlich mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Nach Trocknung mit wasserfreiem Natriumsulfat wurde die Essigester-Ätherphase auf 30 ml eingeengt und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Aus diesem Ansatz hatten sich nach 12-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank weiße Kristallrosetten abgeschieden, die nach Umkristallisation aus einem Essigester-Äther-Petroläthergemisch bei 128-129° schmolzen. Die Ausbeute betrug etwa 12 mg. Der Versuch einer Entacetylierung durch Verseifung mit Bariumhydroxyd scheiterte im wesentlichen an der geringen Menge der zur Verfügung stehenden Substanz, jedoch ließ sich nach 1/2-stündigem Erwärmen der methanolischen Lösung des Acetylierungsproduktes mit 5%iger Bariumhydroxydlösung und darauffolgender Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure papierchromatographisch einwandfrei Aucubin nachweisen.

k) Isolierung des Pseudoindikans R_f 0,76 aus Blättern von Vitex trifolia L. und Vitex negundo L.

Die Blattdroge von Vitex trifolia L., die ich für die Untersuchungen verwendete, stammte aus Indonesien und wurde in der Umgebung von Bandung gesammelt. 800 g der getrockneten und zerkleinerten Blätter wurden in der gleichen Weise aufgearbeitet, wie unter Abschnitt 1a für die Isolierung von Agnusid beschrieben. Die Ausbeute betrug etwa 2,5 g. Schmelzpunkt: 146°.

Nach einer etwas abgewandelten Methode arbeitete ich die

Blattdroge der aus Formosa stammenden Vitex negundo L. auf. Diese Methode erlaubt, für die Isolierung der gesuchten Verbindung kleinere Mengen an Drogenmaterial einzusetzen. - 100 g der getrockneten und zerkleinerten Blätter wurden mit 500 ml Methanol, dem 0,5 g Calciumcarbonat zugesetzt waren, heiß extrahiert. Der vom Drogenrückstand abgepreßte und filtrierte methanolische Auszug wurde zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 500 ml heißem Wasser aufgenommen. Nach dem Erkalten wurde der wäßrige Auszug filtriert und so lange mit Petroläther ausgeschüttelt, bis die Petrolätherphase farblos blieb. Zur Entfernung störender Pigmente und anderer Ballaststoffe wurde die wäßrige Extraktflüssigkeit über neutrales Aluminiumoxyd filtriert. Das Aluminiumoxyd wurde mit 300 ml Wasser nachgewaschen. Nach dem Einengen des nahezu farblosen Eluates auf 100 ml wurde so lange mit Essigester ausgeschüttelt, bis in der Essigesterphase nur noch geringe Mengen an Pseudoindikan nachweisbar waren. Aus der bis zur Trübung eingeengten Essigesterphase schied sich nach dem Erkalten die Substanz R_f 0,76 als weiße Kruste an den Gefäßwandungen ab. Sie besaß nach Umkristallisation aus Äthanol-Äther einen Schmelzpunkt von 146°. Die Ausbeute betrug etwa 0,2 g.

1) Identifizierung der isolierten Verbindungen R_f 0,76 mit Agnusid.

Die naheliegende Vermutung, daß es sich bei Agnusid und den aus Vitex trifolia und Vitex negundo isolierten Substanzen um identische Verbindungen handelt, wurde bewiesen durch:

α) Mischschmelzpunkt mit Agnusid aus Vitex agnus castus.- Die chromatographisch reinen Substanzen wurden aus Äthanol, dem eine geringe Menge Äther beigemischt war, umkristallisiert. Nach 24-stündiger Trocknung über Calciumchlorid wurden die Schmelzpunkte mit dem Heiztischmikroskop der Fa.LEITZ bestimmt. Alle Schmelzpunkte und die Mischschmelzpunkte mit authentischem Agnusid lagen bei 146°.

ß) UV-Absorptionsspektren. Die UV-Absorptionsspektren wurden mit dem UV-Spektralphotometer PM QII der Fa.ZEISS aufgenommen. Gemessen wurden Lösungen der Pseudoindikane in Methanol p.A. "MERCK" in Konzentrationen von etwa 10^{-4}g/100 ml. Die gemessenen Maxima und Minima sind in folgender Tabelle gegenübergestellt:

Pseudoindikan aus	mg/100 ml	λ_{max}	$e_{spez.}$	λ_{min}
V.agnus castus (Agnusid)	1,70	259 mμ	31,4	226 mμ
V. trifolia	1,60	259 mμ	31,3	226 mμ
V. negundo	1,60	259 mμ	30,3	226 mμ

Tab.6: UV-Absorption der isolierten Pseudoindikane R_f 0,76

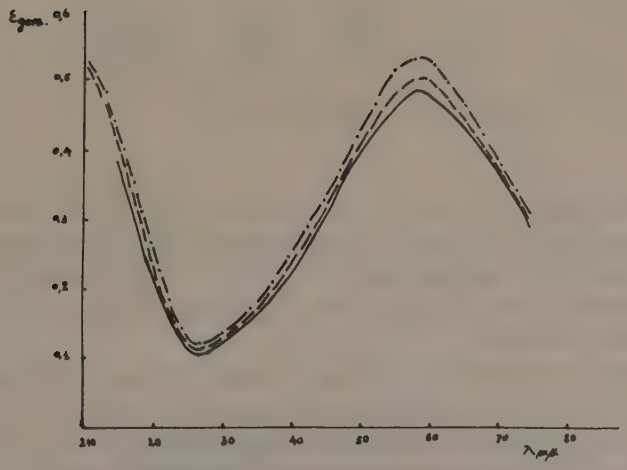


Abb.13: UV-Spektren von Agnusid aus
——— V.agnus castus, —·—· V.negundo
— — — V.trifolia,

γ) Papierchromatographie. Von den aus Vitex agnus castus, V.trifolia und V.negundo isolierten Pseudoindikanen wurden 1%ige Lösungen hergestellt. Je 0,2 ml dieser Lösungen wurden abwechselnd nebeneinander auf den Startpunkten der Chromatogramme (Papier SCHLEICHER u.SCHÜLL, 2043 b) angereichert und dann im aufsteigenden Verfahren chromatographiert. Folgende Laufmittel kamen zur Anwendung:

a) Buntanol/Eisessig/Wasser, 4:1:5, v/v/v

b) m-Kresol/Eisessig/Wasser, 50:2:48, v/v/v

c) 5% NaCl in H_2O

Die erhaltenen R_f-Werte der durch Besprühen mit 5%iger, methanolischer Trichloressigsäurelösung und nachfolgendem Erhitzen des Chromatogramms auf 100° sichtbar gemachten Pseudoindikane sind in folgender Tabelle gegenübergestellt:

Pseudoindikan aus	Laufmittel a	b	c
Vitex agnus castus (Agnusid)	0,76	0,92	0,65
Vitex trifolia	0,76	0,92	0,65
Vitex negundo	0,76	0,92	0,65

Tab.7: Vergleichende Chromatographie der isolierten Pseudoindikane

δ) Acetylderivate. Wie unter 1d beschrieben, wurden die Pseudoindikane von Vitex trifolia und V.negundo acetyliert. Beide Acetylderivate schmolzen bei 126°. Im Mischschmelzpunkt mit acetyliertem Agnusid konnte keine Schmelzpunktsdepression beobachtet werden.

ε) Alkalische Verseifung der Pseudoindikane. Die aus Vitex negundo und Vitex trifolia isolierten Pseudoindikane wurden in gleicher Weise, wie unter Abschnitt c beschrieben, mit Barytlauge verseift. Das mit verdünnter Schwefelsäure neutralisierte Verseifungsgemisch wurde mit Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:5,

als Laufmittel chromatographiert. Als Spaltprodukte konnten p-Hydroxybenzoesäure (R_f 0,92) und Aucubin (R_f 0,42) in beiden Fällen eindeutig nachgewiesen werden (vgl.Abb.14)

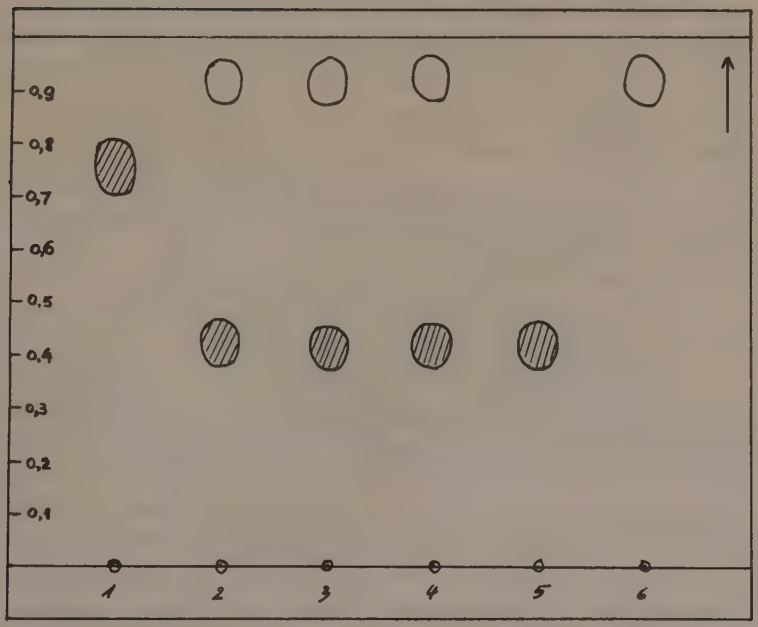


Abb.14: Alkalische Verseifung der Pseudoindikane R_f 0,76 aus Vitex agnus castus, Vitex trifolia und Vitex negundo

Es bedeuten: 1: Agnusid
2: Verseifungsgemisch von V.agnus castus
3: " " " V.trifolia
4: " " " V.negundo
5: Aucubin
6: p-Hydroxybenzoesäure

p-Hydroxybenzoesäure wurde durch Besprühen mit 1%iger, methanolischer $FeCl_3$-Lösung (Gelbfärbung), die Pseudoindikane durch Besprühen mit 5%iger methanolischer Trichloressigsäurelösung und Erhitzen des Chromatogramms auf 100° im Trockenschrank sichtbar gemacht.

3. Die Flavonoide von Vitex agnus castus L.

α) Mikroanalytische Reaktionen auf dem Papierchromatogramm.- Versetzt man den alkoholischen Auszug aus den Blättern von Vitex agnus castus mit etwas Magnesiumpulver und läßt dann 25%ige Salzsäure darauf einwirken, so wird eine deutliche Rotfärbung des Auszuges erzielt. Papierchromatographisch (vgl.S.44 u.45) konnten drei Flavonoide im Vitex-Extrakt erkannt werden, die bei Anwendung des Entwicklungsgemisches Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5, v/v/v) R_f-Werte bei 0,45 (= F1), 0,40 (= F2) und 0,94 (= F3) besitzen. Zur näheren Charakterisierung der Verbindungen wurden die Chromatogramme mit folgenden Sprühreagenzien behandelt:

α) 1%ige methanolische Natriumhydroxydlösung
ß) 1%ige Eisen-3-chloridlösung, methanolisch
γ) 1%ige Lösung von neutralem Bleiacetat in Methanol
δ) 2%ige Lösung von Zirkonoxychlorid in Methanol
ε) Behandlung des Chromatogramms mit NH_3-Dämpfen.

Das Ergebnis ist in folgender Tabelle zusammengefaßt:

	F1 R_f 0,45		F2 R_f 0,40		F3 R_f 0,94	
Behandlung	Tgl.	UV.	Tgl.	UV.	Tgl.	UV.
unbehandelt	hg	d	hg	d	hg	d
NH_3-Dämpfe	g	gbr	g	hg	g	d
$AlCl_3$	g	hg	g	hg	g	d
NaOH	g	hg	g	hg	g	g
$ZrOCl_2$	g	hg	g	hg	g	d
$FeCl_3$	gr	d	gr	d	gr	d
PbAc	g	or	g	or	g	d

Es bedeuten: d= dunkel, g= gelb, hg= hellgelb, gbr= gelbbraun, gr= grün, or= orange, Tgl.= Tageslicht

Tab.8: Papierchromatographische Untersuchungen der Flavonoide F1, F2 und F3

b) Voruntersuchungen zur Isolierung der Flavonoide F1 (R_f 0,45), F2 (R_f 0,40) und F3 (R_f 0,94).

Der methanolische Extrakt aus 100 g Blattdroge von Vitex agnus castus wurde zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde mit 500 ml heißem Wasser behandelt, die wäßrige Phase nach kurzem Stehen abdekantiert, filtriert und schließlich mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherphase hinterließ nach dem Abdampfen geringe Mengen eines grünlich-gelben Rückstandes, der mit Magnesium-Salzsäure eine deutliche Rotfärbung gab, also Flavonoid enthielt. Die papierchromatographische Untersuchung des Rückstandes zeigte die Anwesenheit der Verbindung F3 (R_f 0,94). Aus der Ätherphase konnten nach dem Einengen und Zusatz von Petroläther nach 24-stündigem Stehen gelbe, prismenförmige Kristalle dieser Substanz erhalten werden, die bei 188° auf dem Heiztischmikroskop schmolzen.

Mit dieser Darstellungsmethode sind jedoch nur sehr geringe Ausbeuten zu erzielen. Nachdem der lipophile Charakter der Substanz F3 erkannt war, darüberhinaus festgestellt werden konnte (vgl.S. 71), daß sich die Verbindung in Alkalien leicht zur Lösung bringen läßt und durch Ansäuern der Lösung unverändert zurückerhalten werden kann, wurde ein anderes Verfahren zu ihrer Darstellung ausgearbeitet: 100 g der getrockneten und zerkleinerten Blätter wurden mit 400 ml Chloroform heiß extrahiert. Der Chloroformauszug wurde nach Filtration zur Trockene eingeengt, der Rückstand mit 200 ml wäßriger, 5%iger Natronlauge behandelt. Zur Abtrennung der emulgierten Lipoide wurde zentrifugiert, bis die intensiv gelb gefärbte Lösung nur noch schwach getrübt war. Dann wurde abdekantiert und mit 25%iger Salzsäure angesäuert. Nach etwa 2-stündigem Stehen hatte sich die Substanz F3 in sehr feinen, langen Nadeln kristallin abgeschieden. Die Kristalle setzten sich nur sehr langsam ab, so daß sie abzentrifugiert werden mußten. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgegossen, die Kristalle aus Methanol umkristallisiert. Nach der Umkristallisation wurden wieder gelbe Prismen erhalten, die bei 188-189° schmolzen. Die Ausbeute betrug etwa 0,02 g Substanz F3.

In der wäßrigen Phase blieben nach der Ätherausschüttelung u.a. die Verbindungen F1 und F2 zurück. Die Reaktionen mit Alkali und mit Eisen-3-chlorid (vgl.Tab.8, S.60) wiesen darauf hin, daß auch in diesen Verbindungen freie phenolische Gruppen vorliegen. Für die Auftrennung von Phenolgemischen aber hat sich in den letzten Jahren Polyamidpulver als besonders geeignet erwiesen, so daß auch ich zunächst die Isolierung der gesuchten Flavonoide durch Chromatographie an Polyamid versuchte. Für meine Untersuchungen stand mir das Versuchsprodukt der BASF "P.P. 15 SP" zur Verfügung.

Die wäßrige Phase der Ätherausschüttelung wurde bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 20 ml Methanol aufgenommen. Durch Einschlämmen des Perlonpulvers in ein Chromatographierohr von 2 cm Durchmesser und darauffolgendes Waschen mit Wasser und mit 80%igem Methanol wurde die Chromatographiesäule bereitet, die dann 20 cm hoch war. Auf diese Säule wurde der methanolische Extrakt aufgetragen.

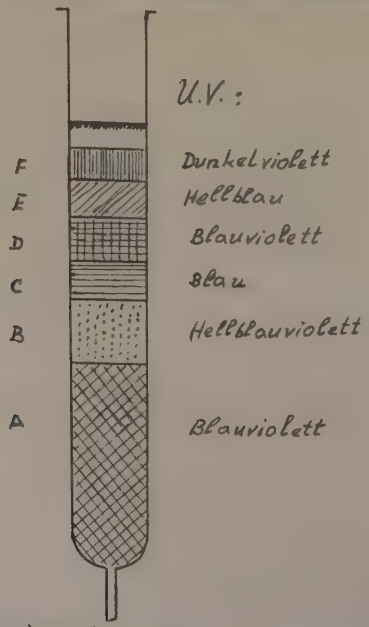


Abb.15: Säulenchromatographie der phenolischen Bestandteile von Vitex agnus castus

Zunächst wurde so lange mit Wasser eluiert, bis sich im durchlaufenden Eluat kein Pseudoindikan mehr nachweisen ließ. Die phenolischen Bestandteile, also auch die Flavonoide, blieben noch am Säulenkopf hängen. Dann wurde als Elutionsmittel 70%iges Methanol eingesetzt, wobei es zunächst zu einer Auftrennung in 6 gut gegeneinander abgegrenzte Zonen kam (vgl. Abb.15). Die Auftrennung und Wanderung der Zonen wurde laufend im UV-Licht kontrolliert. Die im Eluat austretenden Zonen wurden getrennt aufgefangen. In der im UV-Licht dunkelviolett erscheinenden Zone F erfolgte erst im unteren Drittel der Säule eine Auftrennung in zwei deutlich gegeneinander abgegrenzte Zonen F1 und F2. Die diesen Zonen entsprechenden Fraktionen wurden auf je 10 ml eingeengt und eine Woche lang im Kühlschrank aufbewahrt. Aus beiden Fraktionen schieden sich in dieser Zeit geringe Mengen von nadelförmigen Kristallen ab. Sie wurden abfiltriert, mit Äther gewaschen und über Calciumchlorid getrocknet. Die Schmelzpunkte lagen dann für F1 bei 245°, für F2 bei 258°.

c) Isolierung von F3 aus den Blättern von Vitex agnus castus L.

3 kg der gepulverten Blattdroge wurden mit 6 L Chloroform ausgekocht. Der Auszug wurde filtriert und bis zur restlosen Entfernung des Chloroforms eingedampft. Es blieb ein dunkelgrüner, zähflüssiger Rückstand zurück, der nun mehrmals mit je 200 ml 40° warmer, 5%iger, wäßriger Natronlauge durchgeschüttelt wurde. Nach kurzem Absetzen wurde jedesmal die überstehende, bräunlich-trübe Flüssigkeit abgegossen. Der wäßrig-alkalische Extrakt wurde dann mit 25%iger Salzsäure schwach angesäuert und über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

In dichten Büscheln hatten sich haarfeine Kristallnadeln abgeschieden, die allerdings noch durch größere Mengen mitausgefällter, kolloider Bestandteile verunreinigt waren. Daher wurden die Kristalle nach Abfiltration in Chloroform gelöst und die Chloroformlösung so lange mit 5%iger Natronlauge ausgeschüttelt, bis keine wesentlichen Mengen Flavonoid mehr nachweisbar waren. Nach dem Ansäuern wurde der Ansatz wiederum in den Kühlschrank gestellt. Die

nach 24 Stunden ausgeschiedenen Kristalle, die noch immer reichlich Verunreinigungen aufwiesen, wurden auf einem Filter gesammelt, getrocknet, dann in Chloroform gelöst und die Lösung über eine kleine Adsorptionssäule (Ø = 55 mm, h = 150 mm) von neutralem Aluminiumoxyd filtriert.

Das Flavonoid blieb am Säulenkopf adsorbiert, während die verunreinigenden Begleitstoffe zunächst durch 500 ml Chloroform, dann mit 1 L Methanol und schließlich mit 200 ml Wasser ausgewaschen werden konnten. Dann wurde die Säule aus dem Rohr ausgestoßen und die gelb gefärbte, das Flavonoid enthaltende Zone von dem farblosen Anteil der Säule und einer dünnen, oberflächlichen, bräunlichen Schicht, die den Säulenkopf bedeckte, abgetrennt. Durch Behandlung der gelben Zone mit 5%iger Natronlauge konnte der überwiegende Teil des adsorbierten Flavonoids in Lösung gebracht werden. Es wurde angesäuert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Rückstand der vereinigten und zur Trockene eingedampften Chloroformausschüttelungen wurde in heißem Äthanol aufgenommen. Beim Erkalten fielen kleine, prismatische bis nadelförmige, gelbe Kriställchen aus, die bei 188-189° schmolzen. Die Ausbeute betrug 620 mg (~ 0,02%).

d) Isolierung von Flund F2 aus Blattextrakten von Vitex agnus castus.

Auf Grund der Ergebnisse der Voruntersuchungen konnte nun die Darstellung der Flavonoide in größerem Maßstabe in Angriff genommen werden. 2,5 kg getrockneter und grob pulverisierter Blätter wurden zweimal im Autoklaven mit je 8 L Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt wurde zur Aufarbeitung auf die Verbindung F3 (vgl.Abschn.III/c) vorerst beiseitegestellt. Nach Abdunsten des noch anhaftenden Chloroforms wurde die Blattdroge zweimal mit je 8 L Methanol ausgekocht, der Auszug abgepreßt und filtriert. Das Filtrat wurde dann bis zur restlosen Entfernung des Methanols eingedampft. In Portionen zu je 500 ml wurde dann heißes Wasser auf den Rückstand gegeben und kräftig durchgeschüttelt. Nach kurzem Stehen wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen. Diese Behandlung

wurde so lange fortgesetzt, bis sich in der wäßrigen Flüssigkeit keine Flavonoide mehr nachweisen ließen. Nun wurde die abdekantierte und filtrierte wäßrige Flüssigkeit - insgesamt 5 L - im Umlaufverdampfer bei 40°auf etwa 500 ml eingeengt. Das Konzentrat wurde 24 Stunden lang in einem Perforator mit Essigester perforiert. Neben den gesuchten Flavonoiden waren in dem Perforat noch Agnusid und einige, noch nicht näher identifizierte phenolische Bestandteile enthalten. Das Perforat wurde zur Trockene eingeengt, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und mit 50 g Polyamidpulver, das vorher mit 70%igem Methanol gewaschen worden war, zu einer homogenen Masse verrieben.

Zur Herstellung der Chromatographiesäule wurden 300 g Polyamid "Versuchsprodukt P.P. 15 SP" der BASF in 1 L Wasser suspendiert und in ein Chromatographierohr von 6,5 cm Durchmesser eingeschlämmt. Nach dem Absetzen wurde mit 1 L Wasser, dann mit 70%igem Methanol nachgewaschen, bis das ablaufende Filtrat keinen Rückstand beim Abdampfen mehr hinterließ. Schließlich wurde noch einmal mit 1 L Wasser durchgewaschen. Sobald der Flüssigkeitsspiegel auf eine Höhe von etwa 5 cm über dem Säulenkopf abgesunken war, wurde unter vorsichtigem Umrühren die Verreibung aufgetragen und nach dem Absetzen des Pulvers mit einer Scheibe Filtrierpapier und einer etwa 2 cm hohen Schicht Seesand abgedeckt. Der Seesand sollte ein Aufwirbeln des Polyamidpulvers bei Zugabe von Flüssigkeit verhindern.

Mit 20%igem Methanol wurde nun so lange eluiert, bis das Eluat keine Pseudoindikan-Reaktion mehr gab. Hierzu wurden etwa 1,5 L des Elutionsmittels benötigt. Die weitere Elution mit 70%igem Methanol vollzog sich nun, wie unter Abschn. 3 b beschrieben. Im UV-Licht konnte allerdings beobachtet werden, daß sich auch die Zonen C und E in die Zonen C1 und C2 bzw. E1 und E2 auftrennten. Die etwa gleich breiten Zonen F1 und F2 ließen sich auch hier gut voneinander getrennt eluieren. Unter vermindertem Druck wurden die Eluate auf jeweils 25 ml eingeengt und zur Kristallisation 24 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt. Die auskristallisierten Flavonoide wurden durch dreimalige Umkristallisation aus 50%igem Äthanol gereinigt. Es wurden auf diese Weise 180 mg F1 (Smp.245°Zers.) und 150 mg F2 (Smp.258-60° Zers.) erhalten.

e) Reduktionsproben nach SHINODA und nach PEW.

Nach SHINODA (54) wurden einige Kriställchen der Substanzen F1, F2 und F3 in wenig Methanol zur Lösung gebracht, mit einer Messerspitze Magnesiumpulver und dann mit einigen Tropfen 25%iger Salzsäure versetzt. Unter lebhafter Wasserstoffentwicklung nahmen alle drei Lösungen eine rotorange Färbung an.

Wurde nach PEW (55) anstelle des Magnesiumpulvers Zinkgranulat verwendet, so konnte nach einigen Minuten eine rosa Färbung beobachtet werden.

f) Der TAUBÖCK-Test.

Einige Kriställchen der Flavonoide F1 und F2 und F3 wurden in wenig Aceton gelöst und mit jeweils einer Messerspitze Borsäure und Oxalsäure in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft. Bei F1 und F2 färbte sich der Rückstand intensiv gelb, bei F3 trat nur eine kaum erkennbare Verfärbung auf. Der Rückstand wurde in Äther aufgenommen, wobei die Färbung von F1 und F2 bald verblaßte. Eine Fluorescenz konnte unter der UV.Lampe weder bei F1 noch bei F2 oder F3 beobachtet werden.

g) Optische Drehung.

97,4 mg F3 wurden in 5 ml Chloroform gelöst. Diese Lösung wurde in einem 100 mm-Rohr mit einem Polarimeter nach LIPPICH und nach LIPPICH-LANDOLT (Fa.SCHMIDT-HAENSCH, Berlin) bei 20° gemessen; es konnte keine Ablenkung des polarisierten Lichtstrahls beobachtet werden. Die optische Drehung betrug somit

$$[\alpha]_D^{20} = \pm\ 0^\circ$$

Von F1 und F2 stand mir zu wenig Substanz zur Verfügung, so daß ich in diesen Fällen auf die Messung der optischen Drehung verzichten mußte.

h) Säurehydrolyse.

α) Untersuchung der Aglyka. Je 50 mg der Flavonoide F1 und F2 wurden in wenig Methanol gelöst und mit 10 ml 8%iger Schwefelsäure sechs Stunden lang auf dem siedenden Wasserbade unter Rückfluß erhitzt.

Während des Erkaltens kristallisiert das Aglykon der Verbindung F2 in kleinen, gelben Nadeln aus dem Hydrolysegemisch aus. Es wurde abfiltriert und zur Reinigung aus 50%igem Methanol umkristallisiert. Die Substanz schmolz dann bei 328-330°. Ausbeute: ca. 30 mg.

Verbindung F1 wurde unter den gleichen Bedingungen nur teilweise hydrolysiert. Das Aglykon konnte nicht kristallisiert erhalten werden. Vierstündiges Erhitzen in einer Mischung aus 35 ml Eisessig, 55 ml Wasser und 10 ml 37%iger Salzsäure (KILIANI-Mischung) führte zwar zu einer weitergehenden Aufspaltung des Glykosides, jedoch trat hierbei bereits teilweise Zersetzung des Aglykons ein. Wegen Mangel an Substanz beschränkte ich meine Untersuchungen daher auf einen papierchromatographischen Vergleich der Spaltprodukte:

Substanz	R_f in Laufmittel I	II	III	Sprühreagentien a α	a ß	b α	b ß	c α	c ß	d α	d ß
F1 (Glykosid)	0,45	0,42	0,54	g	hg	g	hg	g	or	g	hg
F1-Aglykon	0,80	0,24	0,31	g	hg	g	hg	g	or	g	g
F2 (Glykosid)	0,40	0,50	0,32	g	hg	g	hg	g	or	g	hg
F2-Aglykon	0,80	0,67	0,19	g	hg	g	hg	g	or	g	g

Tabelle 9: Vergleichende Chromatographie der durch Hydrolyse erhaltenen Aglyka von F1 und F2

Als Laufmittel wurden verwendet:

I: Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:5, v/v/v (aufsteigend, Laufzeit 5 Stunden)

II: m-Kresol-Eisessig-Wasser, 50:2:48, v/v/v (aufsteigend, Laufzeit 13 Stunden)

III: Eisessig-Wasser, 30:70, v/v (aufsteigend, Laufzeit 3 1/2 Stunden)

Die Chromatogramme wurden besprüht mit

a) 1%iger methanolischer Natriumhydroxydlösung

b) 1%iger Lösung von Aluminiumchlorid in Methanol

c) 1%iger methanolischer Bleiacetatlösung

d) 2%iger Lösung von Zirkonoxychlorid in Methanol

Betrachtet wurden die so behandelten Chromatogramme

α) im Tageslicht

ß) unter der UV-Analysenlampe

Längeres Kochen der Verbindung F3 in verdünnten Säuren führt zu keiner Veränderung der Substanz. In konzentrierter Schwefelsäure löst sich F3 unter intensiver Gelbfärbung. Die Verbindung ist in konzentrierter Salzsäure leicht löslich und kristallisiert daraus beim Verdünnen mit Wasser in langen, haarfeinen Nadeln wieder aus.

ß) Identifizierung der Zuckeranteile von F1 und F2. Die Identifizierung der Zuckeranteile von F1 und F2 erfolgte papierchromatographisch, im Falle der Verbindung F2 auch als Osazon. Chromatographiert wurden die auf ca. 1 ml eingeengten Hydrolyseflüssigkeiten nach Neutralisation mit Bariumcarbonat und Abfiltration des ausgefallenen Bariumsulfates. Als Vergleichssubstanzen wurden Glukose, Galaktose, Rhamnose, Fruktose und Mannose mitlaufen gelassen. Folgende Laufmittel wurden verwendet:

a) Pyridin-Essigester-Wasser, 1:2:2, v/v/v (aufsteigend, Laufzeit 10 Stunden)

b) Picolin-Ammoniak (10%)-Wasser, 70:2:28 (aufsteigend, Laufzeit 18 Stunden).

Nach Trocknung wurden die Chromatogramme mit Anilin-Phthalsäure-reagenz (0,93 g Anilin und 1,66 g Phthalsäure in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst) besprüht und 10 Minuten lang im Trockenschrank auf 105° erhitzt. Die Auswertung der so behandelten Chromatogramme bringt folgende Tabelle:

Zucker	R_f in Laufmittel		Farbe des Fleckens	
	a	b	Tgl.	U.V.
F1-Zucker	0,38	0,76	braun	gelb
F2-Zucker	0,38	0,76	"	"
Glukose	0,38	0,76	"	"
Galaktose	0,47	0,79	"	"
Mannose	0,31	0,71	"	"
Fruktose	0,43	0,74	"	grüngelb
Rhamnose	0,59	0,89	rotbraun	rot

Tabelle 10: Chromatographie der Zucker von F1 und F2

Das Osazon des aus F2 abgespaltenen Zuckers wurde auf folgendem Wege erhalten: Nach zweistündiger Hydrolyse von 50 mg F2 mit 10 ml 8%iger Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbade wurde das Gemisch erkalten gelassen und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die abgeschiedenen Kristalle des Aglykons wurden abfiltriert, das Filtrat mit Bariumcarbonat unter Erwärmen neutralisiert und zentrifugiert. Von dem abgesetzten Bariumsulfat wurde die überstehende, klare Flüssigkeit abdekantiert. Sie wurde auf ca. 1 ml eingedampft und dann mit 1 ml einer Lösung von 10g Phenylhydrazin - Hydrochlorid und 15 g Natriumacetat in 100 ml Wasser durchmischt und 30 Minuten lang auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Abkühlen fielen gelbe Kristalle aus, die auf einer Glasfilternutsche gesammelt und dann aus 50%igem Äthanol umkristallisiert wurden. Nach 24-stündiger Trocknung über Calciumchlorid im evakuierten Exsikkator schmolzen die Kristalle bei 208-210°. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Glukosazon, das auf gleiche Art bereitet wurde, zeigte keine Depression.

i) Perjodsäureabbau von F1 und F2.

Der Vorschrift von VISCONTINI, HOCH und KARRER (66) entsprechend wurden je 2,5 mg der Flavonoide F1, F2, Vitexin und Luteolin-7-glukosid mit jeweils 2 mg Natriumperjodat in 0,1 ml Wasser gelöst. Nach 4 Stunden wurde je 0,1 ml einer 2%igen, wäßrigen Lösung von Natriumborhydrid hinzugefügt. Das Gemisch blieb über Nacht stehen und wurde dann nach Zugabe von je 0,2 ml Salzsäure (10%) 15 Minuten lang auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten wurden die Lösungen auf jeweils 0,5 ml aufgefüllt. Davon wurden je 0,02 ml auf den Startpunkten des Chromatogramms angereichert. Nach 5-stündiger, absteigender Chromatographie mit dem Laufmittel Essigester-Pyridin-Wasser, 7:2:1 (v/v/v) wurde das Chromatogramm getrocknet und zuerst mit 0,5%iger Natriumperjodatlösung und nach 5 Minuten mit einer Lösung von 0,5 g Benzidin in einem Gemisch von 20 ml Eisessig und 80 ml Äthanol besprüht. Glycerin und Äthylenglykol, die als Vergleichssubstanzen mitliefen,

wurden als weiße Flecken auf blauem Grunde sichtbar.

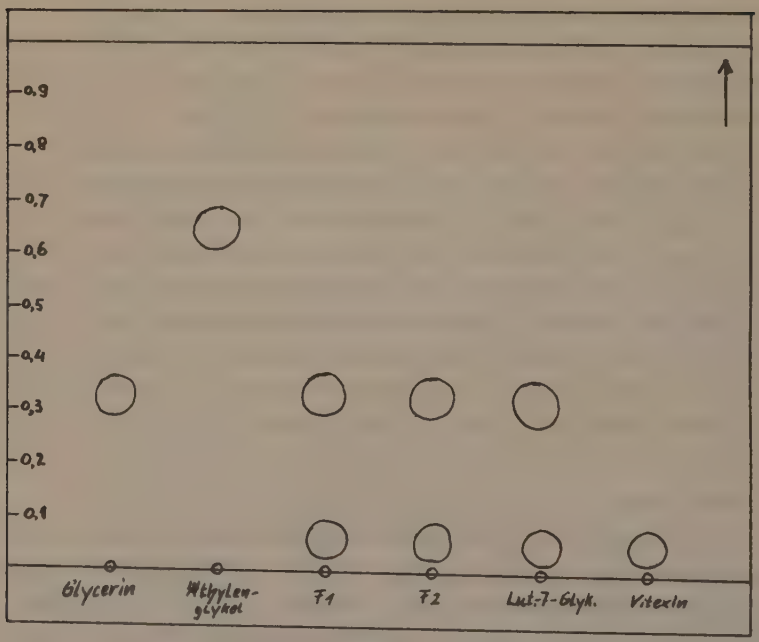


Abb. 16: Chromatographie der Abbauprodukte von F1, F2, Vitexin u.Luteolin-7-glukosid

k) Acetylierung von F3.

Wegen Substanzmangel konnte nur die Verbindung F3 acetyliert werden. 90 mg der Verbindung F3 wurden in 10 Tropfen Pyridin zur Lösung gebracht, mit 2 ml Essigsäureanhydrid versetzt und dann 72 Stunden lang stehen gelassen. Danach wurde der Ansatz noch eine Stunde lang auf dem Wasserbad auf 60° erwärmt. Nach dem Erkalten

wurden 5 ml Eiswasser hinzugefügt, worauf das Acetylprodukt in weißen Kriställchen ausfiel. Die Kristalle wurden aus Methanol umkristallisiert und schmolzen dann bei 182°. Eine Kontrollprobe mit Eisen-3-chlorid auf noch unveresterte phenolische Gruppen fiel negativ aus.
Die Acetylbestimmung *) ergab einen Gehalt von 16,97% CH_3CO. Berechnet wurden für 2 Acetylgruppen 18,64% CH_3CO. Aus der Elementaranalyse*) lassen sich folgende Werte errechnen:

Acetylprodukt F3 (Diacetat):
$C_{23}H_{24}O_{10}$:

Ber.:	C	60,00%	H	5,25%	O 34,75%
Gef.:		60,66%		5,04%	34,30%

1) Verhalten von F1, F2 und F3 gegenüber Alkali; die Alkalischmelze.-
In schwach alkalischer Lösung sind die Verbindungen F1, F2 und F3 in der Kälte beständig. Beim Erwärmen jedoch werden F1 und F2 schnell zersetzt. Demgegenüber erweist sich das Flavonoid F3 gegenüber Alkali als außerordentlich stabil. Es löst sich leicht in verdünnter Natronlauge, wobei sich die gelbe Farbe nur wenig intensiviert. Wird die Lösung neutralisiert oder schwach angesäuert, fällt die Verbindung kristallin und unverändert wieder aus. Selbst beim Kochen mit verdünnten Laugen konnte keine merkliche Zersetzung beobachtet werden. Erst die Alkalischmelze führte zu einem quantitativen Abbau. 5 mg der Substanzen F1, F2 und F3 wurden mit je 4-5 rotuli KOH in Reagensgläsern auf einem Paraffinbad einige Minuten lang auf 205° erhitzt. Nach dem Erkalten wurden die erstarrten Schmelzen in wenig Wasser gelöst und vorsichtig mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert. Dann wurde mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt. Die abgetrennte Ätherphase wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 0,5 ml Methanol aufgenommen. Je 0,1 ml davon wurden auf den Startpunkten des Chromatogramms angereichert und mit dem Laufmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) aufsteigend chromatographiert. Als Vergleichs-

*) Die Bestimmungen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Fa.SCHERING A.G., Berlin, durchgeführt.

substanzen liefen Resorcin, Phloroglucin, p-Hydroxybenzoesäure und Protocatechusäure mit. Die getrockneten Chromatogramme wurden zunächst unbehandelt unter der Analysenquarzlampe (a) und unter der Purinlampe (b), dann nach Behandlung mit Ammoniakdämpfen im ultravioletten Licht (c) betrachtet. Zusätzlich erfolgte eine Charakterisierung der Flecken durch Kuppelung mit diazotierter Sulfanilsäure (d) und mit diazotiertem p-Nitranilin (e) auf dem Chromatogramm, wodurch entsprechende Färbungen erzielt werden konnten.

Substanz	R_f	a	b	c	d	e
Abbau F1	0,69	--	d	--	or	g
	0,80	d	d	d	brV	hg
	0,93	--	d	--	or	g
Abbau F2	0,67	hb	hb	b	or	g
	0,80	d	d	d	gr	grV
Abbau F3	0,69	--	--	d	or	g
	0,80	d	d	d	gr	grV
	0,93	--	--	d	or	g
Resorcin	0,90	--	d	--	g	g
Phloroglucin	0,67	hb	hb	b	org	g
p-Hydroxy-benzoesäure	0,92	--	d	--	g	r
Protocatechu-säure	0,80	d	d	d	gr	grV

Tabelle 11: Chromatographie des Alkaliabbaus von F1,F2 und F3

Es bedeuten: d = dunkel, g = gelb, hg = hellgelb, gr = grau, r = rot, grV = grauviolett, b = blau, hb = hellblau, or = orange

m) Elementaranalyse.*)

Die Substanzen F1 und F2 wurden mehrmals aus 50%igem Äthanol F3 aus 96%igem Äthanol umkristallisiert und dann 72 Stunden

lang in der Trockenpistole über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es wurden sowohl C- und H-Bestimmungen, als auch Sauerstoffbestimmungen durchgeführt.

F1 : $C_{22}H_{24}O_{12}$, M.G. 480,41

Ber.:	C	55,00 %	H	5,04 %	O	39,97%
Gef.:		55,31 %		5,05 %		39,59%
		55,21 %		4,77 %		

F2 : $C_{21}H_{20}O_{11}$, M.G. 448,37

Ber.:	C	56,25 %	H	4,50%	O	39,25%
Gef.:		55,74 %		4,80%		39,05%
		55,93 %		4,89%		

F3 : $C_{19}H_{20}O_8$ M.G. Ber.: 376,35
Gef.: 378,00

Ber.:	C	60,63 %	H	5,36 %
		61,64 %		5,06 %
		61,10 %		5,05 %

n) UV-Absorptionsspektren.

Die Absorptionsspektren der Flavonoide wurden mit dem Spektralphotometer PMQ II der Fa. C.ZEISS aufgenommen. Gemessen wurden Konzentrationen von durchschnittlich 1,5 X 10^{-4}g/100 ml bei einer Schichtdicke von 1 cm.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: Von den Flavonoiden F1, F2, F3 und Luteolin-7-glukosid wurden Stammlösungen bestimmter Konzentration in jeweils 100 ml analysenreinem Methanol hergestellt und zwar von

F1:	5,4 mg/100 ml
F2:	6,6 mg/100 ml
F3:	3,5 mg/100 ml
Luteolin-7-glukosid:	6,6 mg/100 ml

Ferner wurden folgende Stammlösungen bereitet:

1) 5 g wasserfreies Natriumacetat in 100 ml Methanol
2) 5 g Borsäure in 100 ml Methanol
3) 0,055 g Natriummethylat in 100 ml Methanol (= 0,01 molare Lösung)
4) 2,5 g Aluminiumchlorid in 100 ml Methanol.

Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte

a) in methanolischer Lösung. Es wurden je 1 ml der Reagenslösung 1 mit 2 ml der jeweiligen Stammlösung gemischt und mit Methanol auf 10 ml verdünnt. Die Vergleichsküvette enthielt 1 ml der Reagenslösung 1 und 9 ml Methanol. Nach 10 Minuten wurde gemessen.

b) bei Gegenwart von Natriumacetat und Borsäure. Es wurden 2 ml der Reagenslösung 2, 1 ml der Reagenslösung 1 und 2 ml Stammlösung miteinander vermischt und mit Methanol auf 10 ml verdünnt. Die Vergleichsküvette enthielt 2 ml der Reagenslösung 2 und 1 ml der Reagenslösung 1, mit Methanol auf 10 ml verdünnt. Nach 20 Minuten wurde gemessen.

c) in alkalischem Medium. Es wurden 2 ml der Reagenslösung 3 und 2 ml der jeweiligen Stammlösung miteinander vermischt und mit Methanol auf 10 ml verdünnt. Die Vergleichsküvette enthielt 2 ml der Reagenslösung 3, mit Methanol auf 10 ml verdünnt. 1 Stunde nach Ansetzen der Meßlösung wurde gemessen.

d) bei Gegenwart von Aluminiumchlorid. Es wurden 2 ml der Reagenslösung 4 und 2 ml der jeweiligen Stammlösung miteinander vermischt. Die Vergleichsküvette enthielt 2 ml der Reagenslösung 4, mit Methanol auf 10 ml verdünnt. Nach 10 Minuten wurde gemessen.

Die Ergebnisse der Messungen sind als Kurvenbilder in den Abb.2-5, S.30 u.31 wiedergegeben und in Tab.3, S.33 gegenübergestellt.

c) IR-Spektren.

Die Infrarot-Spektren wurden mit einem BECKMANN-I.R.$_5$-Spektrophotometer gemessen. Für die Messung wurden die Substanzen

in KBr gepreßt. Folgende Banden wurden aufgezeichnet:

F1		F2		F3		Luteolin-7-Glykosid	
cm^{-1}	μ	cm^{-1}	μ	cm^{-1}	μ	cm^{-1}	μ
3425 s	2,92	3425 s	2,92	3425 s	2,92	3425 s	2,92
				2920 s	3,4		
				2860 s	3,5		
1660 s	6,03	1670 s	5,98	1660 s	6,02	1670 s	5,98
1640 s	6,1	1620 s	6,16			1620	6,16
1588 s	6,3			1588 s	6,3		
				1558 s	6,42		
		1510 s	6,6	1520 s	6,58	1510 s	6,6
1497 s	6,68			1492 s	6,7		
1460 s	6,85			1477 s	6,78		
		1452 s	6,88			1452 s	6,88
				1438 s	6,95		
		1392 s	7,16			1392 s	7,16
				1370 s	7,3		
1352 s	7,4	1352 s	7,4			1352 s	7,4
1297 s	7,72			1282,5 s	7,8		
		1275 s	7,83			1275 s	7,83
				1270 s	7,88		
1227 m	8,15			1220 s	8,2		
1192,5s	8,39	1190	8,45			1190	8,45
1178 s	8,5						
1160 s	8,63			1165 s	8,6		
1122 s	8,92			1140 s	8,76		
1110 s	9,02			1118 s	8,95		
1085 s	9,23	1088	9,15	1095 s	9,13	1088	9,15
				1062 s	9,42		
		1032	9,68			1032	9,68
1028 s	9,73			1022,5 s	9,78		
				1000 s	10,0		
985 m	10,15						

→

F1		F2		F3		Luteolin-7-Glykosid	
cm^{-1}	µ	cm^{-1}	µ	cm^{-1}	µ	cm^{-1}	µ
				975 s	10,25		
956 m	10,4						
				937,5 m	10,68		
		877 m	11,4			877 m	11,4
				870 m	11,5		
		862 m	11,57			862 m	11,57
843 s	11,87	840 m	11,88	810 s	12,35	840 m	11,88
		794 m	12,6			794 m	12,6
783 m	12,78						
773 m	12,94	761 m	13,12	770 s	13	761 m	13,12
				737 m	13,55		

Tabelle 12: Gegenüberstellung der in den einzelnen IR-Spektren von F1, F2, F3 und Luteolin-7-Glykosid enthaltenen Banden.

4. Identifizierung von F2 mit Luteolin-7-glukosid.

a) Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt.

Luteolin-7-glukosid und die Verbindung F2 wurden aus 50%igem Methanol umkristallisiert und 24 Stunden lang über Calciumchlorid getrocknet. Beide Substanzen schmolzen bei 258-260°unter Zersetzung. Ein Mischschmelzpunkt beider Substanzen gab keine Depression.

b) Papierchromatographie.

Für die papierchromatographische Identifizierung wurden drei verschiedene Laufmittel angewendet:

1. Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:5, v/v/v
2. Eisessig-Wasser, 3070,v/v
3. m-Kresol-Eisessig-Wasser, 50:2:48, v/v/v

Es wurde aufsteigend über Strecken von ca. 20 cm chromatographiert. (Papier: SCHLEICHER u.SCHÜLL 2043 b).

Flavon	1 R_f	2 R_f	3 R_f
Luteolin-7-glukosid	0,40	0,32	0,50
F2	0,40	0,32	0,50

Tabelle 13

Wurde ein Gemisch von Luteolin-7-glukosid und F2 zweidimensional chromatographiert, so konnte mit keinem der oben bezeichneten Laufmittel eine Auftrennung des Fleckens erzielt werden.

c) Vergleich der Analysenergebnisse von F2 und Luteolin-7-glukosid:

	Luteolin-7-glukosid	F2
Schmelzpunkt	258-260°	258-260°
Bruttoformel	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Aglykon, Smp.	328-330°	328-330°
Zuckeranteil	Glukose	Glukose
Alkali-Abbau	Phloroglucin + Protocatechus.	Phloroglucin + Protocatechus.
UV.-Absorption (Methanol λ_{max_1}	256 mμ	256 mμ
$e_{spez.}$	44,2	44,0
λ_{max_2}	350 mμ	350 mμ
$e_{spez.}$	46,5	46,3

Tabelle 14

5. Weitere phenolische Verbindungen aus den Blättern von Vitex agnus castus.

Wie auf S.65 beschrieben, wurde der an Polyamidpulver adsorbierte wäßrige Rohextrakt aus den Blättern von Vitex agnus castus mit 1,5 L 20%igem Methanol gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde dann bei 40° zur Trockene eingedampft. Es blieb ein braunschwarzer Rückstand, der mehrmals mit Äther ausgekocht wurde. Der ätherische Auszug wurde von den dunklen, unlöslichen Anteilen abfiltriert und zur Trockene eingedampft. Zurück blieb nunmehr eine weiße, kristalline Masse, die beinahe vollständig und ohne Zersetzung bei 190-200° sublimierbar war. Die sublimierten, nadelförmigen Kristalle schmolzen

bei 210-212°. Ein Mischschmelzpunkt mit p-Hydroxybenzoesäure gab keine Depression. p-Hydroxybenzoesäure wurde ferner beim Einengen der Fraktion E1 erhalten.

Das Eluat E3 dagegen enthielt neben kleinen Anteilen p-Hydroxybenzoesäure hauptsächlich eine Substanz, die auf dem Papierchromatogramm bei R_f 0,80 (Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:5, v/v/v) unter der Purinlampe nachgewiesen werden konnte. Da diese Substanz schon bei 150-160° sublimierte, war sie durch fraktionierte Sublimation leicht von der p-Hydroxybenzoesäure abzutrennen. Die erhaltenen prismatischen oder nadelförmigen Kriställchen schmolzen bei 198-200°. Auf papierchromatographischem Wege gelang die Identifizierung mit der als Vergleichssubstanz mitlaufenden Protocatechusäure. Zusätzlich wurden Reaktionen mit diazotierter Sulfanilsäure und mit diazotiertem p-Nitranilin durchgeführt (vgl.Tab.15).

Substanz	R_f in Bu/Ei/Wa 4:1:5	U.V. bei 270mμ	diazot. Sulfanils.	diazot. p-Nitran.
Sublimat bei 150 - 160°	0,80	d	grV	blV
Sublimat bei 190 - 200°	0,94	d	g	r
Protocatechusäure	0,80	d	grV	blV
p-Hydroxybenzoesäure	0,94	d	g	r

Tabelle 15

6) Untersuchungen über die Wirkung von Auszügen aus Vitex agnus castus auf Insekten.

Je 15-20 Wasserflöhe (Cyclops bzw. Daphnien) in je 2 ml Leitungswasser wurden in einzelne Reagensgläser gegeben. Jeder Versuchsansatz bestand aus fünf Gläsern, in die dann je 2 ml Test-

lösung einpipettiert wurden, und einem Kontrollversuch, bei dem anstelle der Testlösung 2 ml Leitungswasser zugesetzt wurden. Als Testlösungen wurden verwendet:

a) das Filtrat einer Auskochung von 2g gepulverter Blattdroge in 10 ml Wasser.
b) das Filtrat einer Kaltmazeration (12 Stunden) von 2 g gepulverter Blattdroge in 10 ml Wasser.
c) das Wasserdampfdestillat aus 50 g Blattdroge (ca. 2 L)
d) der wäßrige Auszug (100 ml) aus 50 g Blattdroge nach Wasserdampfdestillation.
e) das Eluat der Zone A aus der Polyamidsäule (vgl.S.62) ca. 100 ml, auf 20 ml eingeengt.
f) eine 2%ige Lösung von Chlorogensäure in Wasser.
g) eine 0,1%ige Lösung von Agnusid in Wasser.
h) eine 0,05%ige Lösung des Flavonoids F1 in Wasser.
i) eine 0,05%ige Lösung von Luteolin-7-glukosid in Wasser.
k) eine 2%ige Lösung von Protocatechusäure in Wasser.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Testlösung	Cyclops			Daphnien		
	2Std.	5Std.	12Std.	2Std.	5Std.	12Std.
--	0	0	0	0	0	0
a	0	++	+++	+	++	+++
b	0	++	+++	+	++	+++
c	0	+++	+++	+	+++	+++
d	0	++	+++	+	++	+++
e	0	++	+++	+	++	+++
f	0	0	0	0	0	0
g	0	0	0	0	0	0
h	0	0	0	0	0	0
i	0	0	0	0	0	0
k	0	+	+++	+	++	+++

Tabelle 16: Wirkung von Blattextrakten aus Vitex agnus castus auf Cyclops u. Daphnien.

Es bedeuten: 0:unwirksam, +:Motilität gehemmt, ++:bewegungslos, +++:abgetötet.

Literaturverzeichnis

1. A.SCHNEEGANS : J.Pharm.Els.-Lothr.24 (1897) 38
2. H.ERBRING, W.WULF : Madaus-Jahresbericht 1952
3. E.WINDE: Untersuchungen über die Verbreitung der Pseudoindikane - Agnosid, ein neues Pseudoindikan aus Vitex agnus castus L.; Dissertation Berlin 1959
4. LANDERER : Buchner's Repertorium, Bd. 54 (1835)
5. A.ORECHOFF : Arch.Pharm.272 (1934) 673
6. E.WINDE, R.HÄNSEL : Arch.Pharm.Ber.Dtsch.Pharm.Ges.293/65 (1960) 556-567
7. T.P.GHOSE, S.KRISHNA: J.Ind.Chem.Soc.13 (1936) 634
8. J.BRIQUET : in ENGLER u.PRANTL, Natürl.Pflanzenfam.Bd.IV,3a (1897) 139 ff
9. H.N.MOLDENKE : Materials toward a monograph of the genus Vitex. X.Phytologia 6/3 (1958)
10. H.N.MOLDENKE : A Résumé of the Verbenaceae, Avicennaceae, Stilbaceae, Symphoremaceae and Eriocaulaceae. New Jersey 1959.
11. S.JUNELL : Zur Gynäceummorphologie und Systematik der Verbenaceen und Labiaten, Dissertation, Uppsala 1934
12. G.HEGI : Illustrierte Flora von Mitteleuropa, München Bd.V/3(1906) 2233
13. C.BENTHAM : Flora australensis, London 1870, Vol. 5
14. P.DOP : Les vitex de l'Indochine, Travaux de Laboratoire Forestier de Toulouse, Bd.I, Art.1, 1928-33
15. K.BREITWIESER: Pharmakognostische Untersuchungen über Verbenaceen, Habilitationsschrift, Braunschweig 1942
16. Th.PECKOLT : Ber.Dtsch.Pharm.Ges.14 (1904)
17. DIOSCORIDES : Arzneimittellehre, i.d.Übers.v.J.BERENDES, Stuttgart 1902, 119 u.395
18. L.KRÖBER : Heil- und Gewürzpflanzen, Bd. 15 (1933)74
19. F.KOSTELETZKY : Allg.med.pharm.Flora,Prag 1834, 819
20. LINSS : Hippokrates 1939, 413
21. V.PROBST, O.A.ROTH : Dtsch.med.Wochenschr. 79 (1954) 1271
22. R.MOHR : Dtsch.med.Wochenschr. 79 (1954) 1513
23. J.HALLER : Geburtsh.u.Frauenhlkd.18 (1958) 1347

24. J.MAISCH : The Pharm.J.and Transact. (1885) 86

25. K.M.NADKARNI : Indian Materia medica, Vol.I, Bombay 1954,1279 ff.

26. W.DYMOCK, C.WARDEN, F.HOOPER : Pharmakographia indica, London 1893, Pars 6, 57

27. M.J.van STEENIS-KRUSEMAN: Org.f.Scientif.Res.in Indonesia Bull.No.18 (1953) 49

28. N.K.BASU, G.B.SINGH : Quart.J.Pharm.Pharmacol.20 (1947) 136

29. HAGER, Handb.d.Pharmazeut.Praxis, Erg.-Bd.,Berlin-Heidelberg-Göttingen 1949, 168

30. H.HOPPE, Drogenkunde, Hamburg 1958, 953

31. J.v.WIESNER: Die Rohstoffe des Pflanzenreichs, Bd.III,Leipzig 1921, 516

32. K.HEYNE : De nuttige Planten van Nederlandsch Indie, Vol.3, Buitenzorg 1927, 20 sowie Vol.2, S.1315 ff.

33. A.G.PERKIN : J.Chem.Soc.73 (1898) 1019

34. W.H.EVANS, A.McGOOKIN : J.Chem.Soc.(London 1957) 3510

35. L.HÖRHAMMER, H.WAGNER, H.NIESCHLAG, G.WILDI : Arch.pharm.Ber. Dtsch.Pharm.Ges.292/64 (1959) 380

36. L.HÖRHAMMER, H.WAGNER, W.LEEB : Arch.Pharm.Ber.Dtsch.Pharm.Ges. 293/65 (1960) 264

37. T.NAKAOKI, ref. in Chem.Abstr.46 (1952) 108

38. G.BARGER : J.Chem.Soc.89 (1906) 1210

39. R.C.CAMBIE : New Zealand J.Sci.Technol.2 (1959) 230

40. C.B.RAO,V.VENKATESWARLU : Current Science 25/10 (1956) 328

41. U.FIEDLER : Arzneimittelforsch. 5 (1955) 609

42. M.SEIKEL, D.J.HOLDER, R.BIRZGALIS : Arch.Biochem.Biophys.85 (1959) 1

43. M.GRESHOFF : Mededeelingen uit's lands Plantentuin 25 Batavia's Gravenhage 1898, 158

44. A.R.TRIM, R.HILL : Biochem. J. 50 (1952) 310

45. J.ELICH : Dissertation, Berlin (z.Zt.in Vorbereitung)

46. P.KARRER, H.SCHMID : Helv.Chim.Act.29 (1946) 525

47. Y.IWANAMI, Y.HOTA, T.KUBOTA, S.FUJISE, T.ISHIKAWA,H.UDA :ref.in Chem.Zentralbl.130/41 (1959) 13171

48. Y.Nakamura : ref.in Chem.Abstr.45 (1951) 7117

49. J.RABATE : Bull.Soc.Chim.Biol.17 (1935) 328

50. H.SCHIFF : J.LIEBIGs Ann.Chem.154 (1870) 1

51. S.DUTT : ref.in Chem.Zentralbl.(1936) I, 1425

52. S.FUJISE, H.OBARA, H.UDA : Chem.u.Ind.(1960) 289

53. M.W.WENDT, W.HAEGELE, E.SIMONITSCH, H.SCHMID : Helv.chim.Act.43/V (1960) 1440

54. J.SHINODA : J.Pharm.Soc.Jap.48 (1928) 214

55. J.C.PEW : J.Am.Chem.Soc.70 (1948) 3031

56. K.TAUBÖCK : Naturwiss.30 (1942) 439

57. L.JURD, R.M.HOROWITZ : J.org.Chem.22 1618 (1957)

58. L.HÖRHAMMER, R.HÄNSEL : Arch.Pharm.Ber.dtsch.Pharm.Ges.285/57(1952) 438

59. HAGEDORN, R.NEU : Arch.Pharm.Ber.dtsch.Pharm.Ges.286/58 (1953) 486

60. P.PFEIFFER : LIEBIGs Ann.Chem. 389 (1913) 137

61. J.B.HARBORNE : Chem.u.Ind. 1954, 1142

62. T.SWAIN : Chem.u.Ind.1954, 1480

63. L.JURD : Biochem.Biophys.63 (1956) 376

64. St.v.KOSTANECKI : Chem.Ber.26 (1893) 2901

65. H.NAKAMURA, T.OHTA, G.HUKUTI : Chem.Zentralbl.1936, II, 3801

66. M.VISCONTINI, H.HOCH, P.KARRER : Helv.Chim.Act.38 (1955) 642

67. E.FISCHER u.BERGMANN :Chem.Ber.51 (1918) 1760-1787

Lebenslauf

Am 12. November 1928 wurde ich, Midian Daniel Mangaradja Rudji S i r a i t , Sohn des Kaufmannes Imanuel Sirait und seiner Ehefrau Mina geb.Manurung in Porsea (Tapanuli,Sumatra) geboren. Dort wurde ich im August 1935 in die Volksschule eingeschult. Nach dem abgeschlossenen 3.Grundschuljahr besuchte ich eine Holländisch-Indonesische Privatschule in Porsea. Daran schloß sich im Jahre 1943 bis zum März 1945 ein Besuch der Japanischen Technischen Schule in Sibolga (Sumatra) an. Der Mangel an Grundschullehrern machte jedoch eine Notregelung erforderlich, in deren Rahmen ich im Mai 1945 als Grundschullehrer berufen wurde.

Im Oktober 1945 wurde ich dann wieder in die Oberschule eingeschult. In den Jahren 1947 - 1948 (1.holländische militärische Aktion in Indonesien) mußte ich die Schulbank mehrmals verlassen, um eine organisatorische Tätigkeit in der Schülertruppe in Toba (Nord-Sumatra) zu übernehmen. Während der zweiten holländischen militärischen Aktion in Indonesien (1948 - 1949) mußte ich für ein ganzes Jahr meine Schulausbildung unterbrechen und an der Volksverteidigung (Peopel Defence) als Hilfskraft im Sekretariat der Abteilung Organisation und Propaganda in Nord-Tapanuli (Sumatra) teilnehmen.

Erst Anfang 1950 wurde ich wieder in die Oberrealschule in Medan (Sumatra) eingeschult. Im gleichen Jahre begann meine Ausbildung in der Staatlichen Schule für Assistenz-Apotheker in Djakarta, wo ich auch meine Praktikantenzeit absolviert habe. Im Jahre 1952 machte ich das Staatsexamen als Assistenz-Apotheker und erhielt vom Gesundheitsministerium die für ganz Indonesien gültige Erlaubnis für die Tätigkeit als Assistenz-Apotheker.

Danach wurde ich bis August 1953 in einer Staatl.Pharmazeutischen Fabrik angestellt. In der gleichen Zeit besuchte ich die halbstaatliche Abend-Oberrealschule, Abt.Naturwissenschaft, und machte dort mein Abitur. 1953 - 1956 studierte ich an der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Indonesia in Bandung Pharmazie. Gleichzeitig war ich als Assistent von Herrn Professor Dr.B.S.Goei The, dem Direktor des Pharmazeutischen Institutes, im Rezeptur-Praktikum tätig. Dort machte ich im Februar das Examen für Apotheker-Kandidaten.

Auf Einladung der Evangelischen Studentengemeinde in Deutschland kam ich im September 1956 nach Deutschland und studierte an den Universitäten Mainz und Hamburg Pharmazie. Im November 1958 machte ich das Deutsche Pharmazeutische Staatsexamen in Hamburg. In der Absicht, mich nach meiner Rückkehr in meine Heimat den wissenschaftlichen Problemen der Pharmazie zu widmen, begann ich im Januar 1959 im Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem, unter der Leitung von Herrn Professor Dr.HÄNSEL, meine Dissertationsarbeit zur Erlangung der Doktor-Würde.

Fotodruck Arno Brynda, Berlin W 35